



**Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad de Buenos Aires**



**Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Bioquímica Humana.  
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.**

***Regulación y función de la enzima Acil-CoA Sintetasa 4  
involucrada en el control de los niveles de ácido  
araquidónico intracelular***

**Bioquímica Melina Andrea Dattilo**

Directora de Tesis: Dra. Paula Mariana Maloberti

Consejera de Estudios: Dra. Patricia Setton

**2018**

*A mi hermosa familia*

*y en especial a Romina Barello.*

*Muchas son las personas y las instituciones que han acompañado mi formación y crecimiento tanto a nivel científico como personal, y a todos les quiero agradecer la gran ayuda y la presencia que han tenido durante el desarrollo de mi Tesis doctoral.*

*En primer lugar quiero agradecer especialmente a la Dra. Paula Maloberti, ya que confió en mí para ser su primera tesista doctoral. Me ha guiado por este camino con mucha paciencia, inculcándome sus conocimientos, experiencia y amor a la ciencia. Gracias por hacer que mi doctorado fuera una experiencia apasionante. Le agradezco infinitamente sus consejos y su preocupación desde el día de la entrevista hasta el día de hoy, ayudándome a sortear todas las dificultades que fueron apareciendo. Hasta las que parecían imposibles de resolver y sin embargo juntas las pudimos revertir. Su ayuda y su buena predisposición han sido muy importantes en el transitar de este camino académico y también en la búsqueda de las mejores alternativas que me permitieran llevar adelante este trabajo con la mayor armonía posible. Son tantas las cosas que tengo para agradecerle que podría llenar hojas de agradecimientos hacia usted. Me gustaría simplemente resumir todo en una simple frase: agradezco al destino que me ha permitido encontrar a la mejor directora de tesis para mis expectativas, quien me ayudó a transitar este camino incentivándome a desarrollar mi verdadera vocación. Su calidad humana excepcional permitió que pudiera llevar a cabo cada día de este hermoso trabajo con mucha alegría.*

*Quiero agradecer al Dr. Ernesto Podestá por haber dado el consentimiento para que pudiera desarrollar mi tesis doctoral y por lo tanto me abrió las puertas del INBIOMED.*

*Un agradecimiento especial a la Dra. Cristina Paz, quien me ha ayudado desde el primer momento, aún sin conocerme personalmente, con cartas de recomendación y con detalles de escritura en los planes e informes que tuve que presentar durante estos años. Gracias Doctora por haberme escuchado siempre, por sus consejos, consideraciones y por las charlas vespertinas compartidas.*

*Muchas gracias a todo el laboratorio por haberme ayudado cuando lo necesité.*

*A Lucía Herrera, quien llegó en el último período de mi tesis y su llegada fue una gran ayuda en los detalles finales para culminar los experimentos. Muchísimas Gracias.*

*De las becarias a la que más cerca tengo es a Yayi, y más allá de alguna que otra ayuda que nos podamos brindar mutuamente en el laboratorio, lo que más nos une es nuestra coincidencia en ser madres primerizas y becarias doctorales al mismo tiempo. Nunca voy a olvidar que estuviste ahí firme cuando necesité que me levantaran el ánimo para seguir adelante.*

*A alguien que ya no está en el laboratorio pero con quien hemos compartido 2 ó 3 años, Paulita López. Tu legado de resúmenes me ayudó mucho en la escritura de la tesis. Nunca voy a olvidar el entusiasmo que le pusiste al último póster que compartimos. Fue muy lindo compartir experimentos y algunos congresos fuera de Buenos Aires con vos.*

*A Fer, por compartir tus conocimientos y consejos sobre técnicas conmigo. ¡Gracias por ayudarme cuando lo he necesitado! Sos realmente una profesional admirable.*

*A Uli, con quien empecé compartiendo mesada aunque enseguida nos tuvimos que mudar a mesadas diferentes. Te agradezco la ayuda que me brindaste las veces que la necesité y tu buena onda de todos los días.*

*A Ceci, por ser el manual viviente de los secretos ocultos del western blot y la inmunocitoquímica. Gracias por compartir esos secretos y las pipetas. Y muchas gracias por tu buena onda de todos los días y por compartir también algunas tardes de pileta.*

*A Ale, mi compañera vespertina de cuarto de cultivo. Gracias por ofrecerte y colaborar en la corrección en la escritura de la tesis. ¡Te extraño Ale!*

*A Mechi, Andre, Katia, Silvana, Luciana, Ana y Jesi por ayudarme cuando lo he necesitado, por compartir todos los días este trabajo tan hermoso que hemos elegido y distendernos con charlas divertidas en algunos momentos.*

*A Fabiana y a Isabel, por estar siempre atentas a todo y compartir todos los días este lugar de trabajo.*

*A Mayra y a Nadín por el apoyo que brindan al día a día del laboratorio. ¡Mayra, te quiero igual aunque a veces no compartamos los mismos gustos musicales! ¡Sos una genia!*

*A Horacio a quien molesté con muchas consultas médicas para amigos que las necesitaban y siempre tuvo la mejor predisposición para escucharme y escucharlos. Gracias también por aliviarme algunas veces el retorno a casa.*

*Del género masculino me queda agradecer a Charly, Juan, Nico, Matías y Pablo, ¡gracias por mantenerme informada siempre sobre cosas importantes e interesantes!*

*A Albertina y a Luciana por ayudarme con la mejor de las ondas cada vez que mis limitaciones con la computadora o la impresora me jugaron una mala pasada. Gracias por compartir charlas de vida todos los días.*

*A Corina García, por el entrenamiento que me brindaste<varias veces en alguna técnica cuando lo he necesitado y por facilitarme bacterias y células en alguna urgencia que he tenido. Muchísimas gracias por tu ayuda.*

*También al grupo de Carla Caruso por cederme cultivos cuando tenían excedentes. Gracias por estar siempre atentas antes de descartar algo que a mí me pudiera servir.*

*A la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado la beca doctoral que me permitió dedicarme exclusivamente a este apasionante trabajo.*

*A las instituciones ANPCyT, CONICET, INC y a la programación UBACyT por haber otorgado los subsidios que permitieron financiar las compras necesarias para la realización de este trabajo de tesis.*

*De mis amigos en especial a Ramiro Marcos Bracco, quien nunca olvidó cada vez que nos juntamos en estos años en hacer la pregunta “¿Y? ¿Cómo va esa tesis?”. Por escuchar mis largos relatos en respuesta con mucho interés a pesar de que nuestras profesiones nada tengan que ver una con la otra.*

*A mis amigas Alex, María, Mariana y Caro por interesarse por mi carrera y por acompañarme con su amistad antes, ahora y siempre.*

*A mis compañeros de mi anterior trabajo que se pusieron felices de saber que los dejaba para seguir mi verdadera vocación y ser plenamente feliz en esta profesión: Valerita, Lau, Marie, Marisa, Mónica, Maxi y a la DT de ese momento, Liliana Valiente.*

*A mis padres Antonio y Etel, porque me dieron acceso a una educación excelente siempre, desde el jardín de infantes hasta la universidad. Gracias por estimular mi interés en el estudio. A Norma, mi hermana, quien aparte de su rol familiar tuvo su rol académico conmigo enseñándome a leer y a escribir. A mis sobrinos reales y los de la vida que me llenan de alegría y felicidad: Mati, Lucas, Pili, Ana, Juana, Clara y Lucas Dunne. A Vane por su ayuda con Nico en estos últimos días que anduve enloquecida. Mil millones de gracias a Mabel por estar siempre dispuesta a ayudarme con mi hijo y la casa, lograste que este camino se hiciera mucho más fácil. Super agradecida a vos estoy.*

*Te agradezco todo Damián. Si no fuera por vos nunca lo hubiera logrado. Vos me diste el empujón y la seguridad para intentarlo cuando creí que ya no había más chances. Te tengo que agradecer infinitamente el gran apoyo que me brindaste en absolutamente todo durante estos cinco años y medio, para que pueda ser feliz haciendo lo que me gusta. Juntos lo logramos y hoy te puedo decir que seguramente soy la bioquímica más feliz de la tierra. Creo que eso te debe poner muy feliz a vos también. Gracias por el amor que me brindás día a día. Gracias Amor de mi Vida.*

*Y a Nicolás, el mejor regalo que Dios me dio. Mi chiquitito hermoso, gracias por llenar mi vida de felicidad. Por enseñarme día a día lo que es sentir el amor más puro. Porque tengo a alguien por quien luchar... Gracias por tenerle paciencia a tu mami.*

*Finalmente y sobre todas las cosas, gracias a Dios ...*

## *Abreviaturas*

12-HETE	Ácido 12- hidroxieicosatetraenoicos
15-HETE	Ácido 15- hidroxieicosatetraenoicos
15-LOX	15-lipoxigenasa
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5-HETE	Ácido 5- hidroxieicosatetraenoicos
5-HPETE	5- Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
5-LOX	5-lipoxigenasa
8Br-AMPc	8-bromo- Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AA	Ácido araquidónico
AA-CoA	Araquidonoil-CoA
AC	adenil ciclasa
AcK	Acetato de potasio
Acot2	Acil-CoA tioesterasa mitocondrial
ACS	Acil Coenzima-A sintetasa
ACSL	Acil-CoA sintetisas de cadena larga
ACSL1	Acil-CoA sintetasa 1
ACSL3	Acil-CoA sintetasa 3
ACSL4	Acil coenzima-A sintetasa 4
ACSL4_v1	isoforma corta de ACSL4
ACSL4_v2	isoforma larga de ACSL4
ACSL4a	Acil coenzima-A sintetasa 4a
ACSL5	Acil-CoA sintetasa 5
ACSL6	Acil-CoA sintetasa 6
ACSM	Acil-CoA sintetisas de cadena media
ACSS	Acil-CoA sintetisas de cadena corta
ACSVL	Acil-CoA sintetisas de cadena muy larga
ACTH	Adenocorticotrofina

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	desoxirribonucleasa I
ADNc	ADN copia
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AKT	proteína quinasa B (también llamada PKB)
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP subunidad catalítica alfa 1
ANG II	Angiotensina II
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNpi ó siRNA	ARN pequeño de interferencia
ARN Pol II	ARN polimerasa II
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
Bmp	Proteínas morfogénicas del hueso
BO	Bulbo olfatorio
bp	Pares de bases
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CpG	Islas GC
CREB	cAMP response-element binding protein
CysLT	Cisteinil leucotrieno



CysLT1R	Receptor de leucotrienos 1
dAcsI	Enzima homóloga a ACSL3 y ACSL4 en <i>Drosophila melanogaster</i>
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DBI	Inhibidor de unión al diazepam
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHETE	Ácido dihidroxieicosatetraenoico
DMEM	Medio de cultivo para líneas celulares Dulbecco's modified Eagle
DMEM F12	Medio de cultivo para líneas celulares Dulbecco's modified Eagle: nutrient mixture F-12
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
Dpp	Proteína homóloga a Bmp en <i>Drosophila melanogaster</i>
E <sub>2</sub>	Estradiol
EAE	encefalomielitis autoinmune experimental
EDTA	Ácido etilen diamino-tetracético
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFP	Forma mejorada de la proteína fluorescente verde
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetra-acético
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
ER-	que no expresa receptor de estrógeno
ER	Receptor de estrógeno alfa
ER+	que expresa receptor de estrógeno
ERK 1/2	Quinasa activada por señales extracelulares
ERR $\alpha$	Estrogen-Related Receptor alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógeno beta
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos

FSH	Hormona foliculo estimulante
GABA <sub>A</sub>	Receptor γ-amino-butírico tipo A
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Gonadotrofina coriónica placentaria
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
H <sub>2</sub> Od	Agua destilada
HER-2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HETE	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HPA	hipotálamo-pituitario-suprarrenal alterado
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IL-6	Interleucina 6
IP-10	Proteína 10 inducible por interferón γ
IPA	Análisis proteómico funcional
kb	kilo Base
kDa	kilo Dalton
LB	Medio para bacterias Luria Bertani
LCT	Lesión medular traumática
LH	Hormona luteinizante
LMT	Lesión medular traumática
LOX	Lipooxigenasa
LT	Leucotrieno
LTD4	Leucotrieno D4
LTs	Leucotrienos
MAMs	Membranas asociadas a mitocondrias
MAPK	Proteína quinasa activada por mitogenos
MCF-7 tet/off ACSL4	MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 bajo el control de tetraciclina o doxiciclina
miARN	microARN

mir34a	microARN 34a
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MS	Esclerosis múltiple
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Durante toda la noche
OPC	Células progenitoras de oligodendrocitos
P4	Progesterona
P450 <sub>scc</sub>	Complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol citocromo P450
P5	Pregnenolona
p70S6K	Proteína ribosómica S6 quinasa 70 kDa polipéptido 1
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ coactivador 1-alfa
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D2
PGE	Prostaglandina E
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> y fosfolípidos
PLA2	Fosfolipasa A2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR $\gamma$	PPAR gama
PR	Receptor de P4

PTPs	proteínas con actividad de tirosinas fosfatasas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
PUFA-CoA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga-CoA
PVDF	Fluoruro de vinilideno
Rb	Proteína del Retinoblastoma
RIA	Radioinmunoanálisis
RMS	Corriente migratoria rostral
RNAseq	RNA secuencing
ROR $\alpha$	Retinoid-related orphan receptor alpha
rpm	Revoluciones por minuto
RPPA	Reverse phase protein array
R-Smad	Factores de transcripción dependientes de Smad
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SEM	Error estándar de la media
SERD	Reguladores negativos del ER
SERM	Moduladores selectivos del ER
SHP2	Tyrosine Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Sp1	Specifity Protein 1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
SZV	Zona subventricular
TAE	Solución amortiguadora Tris acetato EDTA
TBS	Solución amortiguadora salino de Tris
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
Tris	Hidroximetil amino metano

TRIZOL	Fenol-isotiocianato de guanidina
TSE	Solución amortiguadora salino Tris Sacarosa EDTA
TSPO	Receptor periférico de benzodiazepinas/translocator protein
TSS	Sitios de inicio de la transcripción
TTBS	Solución salina Tris Tween
Tx	Tromboxano
TZD	Droga de la familia de las tiazolidenidionas
UTR	Región no traducible
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
Vim	Vimentina

*Indíce*

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Acil-CoA Sintetasas y Acil-CoA Sintetasas de Cadena Larga</b>	<b>1</b>
<b>2. Acil-CoA Sintetasa 4 (ACSL4)</b>	<b>2</b>
<b>3. Rol de ACSL4 en el metabolismo del ácido araquidónico</b>	<b>6</b>
<b>4. Rol de ACSL4 en la regulación de la esteroidogénesis</b>	<b>8</b>
<b>4.1. Generalidades sobre la esteroidogénesis</b>	<b>8</b>
<b>4.2. Biosíntesis de hormonas esteroides</b>	<b>9</b>
<b>4.3. Regulación hormonal de la esteroidogénesis</b>	<b>11</b>
<b>4.4. Rol del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroidogénesis</b>	<b>13</b>
<b>4.5. Expresión y función de ACSL4 en tejidos esteroidogénicos</b>	<b>14</b>
<b>5. Otras funciones de ACSL4</b>	<b>15</b>
<b>6. Regulación hormonal de la expresión de ACSL4</b>	<b>17</b>
<b>7. Regulación transcripcional de ACSL4</b>	<b>17</b>
<b>8. Otros mecanismos de regulación de ACSL4</b>	<b>19</b>
<b>9. Rol de ACSL4 en cáncer</b>	<b>19</b>
<b>9.1. Breves nociones sobre el cáncer</b>	<b>19</b>
<b>9.1.1. Breves nociones sobre el cáncer de mama</b>	<b>20</b>
<b>9.1.2. Generalidades sobre modelos de cáncer de mama <i>in vitro</i></b>	<b>22</b>
<b>9.2. Rol del metabolismo del ácido araquidónico en la tumorigénesis</b>	<b>23</b>
<b>9.3. Expresión y función de ACSL4 en cáncer</b>	<b>24</b>
<b>10. Rol de ACSL4 en el Sistema Nervioso</b>	<b>27</b>
<b>10.1. Generalidades sobre la neuroglia</b>	<b>27</b>
<b>10.1.1. Funciones de los astrocitos en la glía</b>	<b>27</b>
<b>11. Neurosteroidogénesis</b>	<b>32</b>
<b>11.1. Expresión y función de StAR en el sistema nervioso</b>	<b>33</b>
<b>11.2. Rol de los neuroesteroides en lesiones y patologías del sistema nervioso</b>	<b>35</b>

11.3. Expresión y función de ACSL4 en el sistema nervioso y en el desarrollo embrionario	37
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Materiales y reactivos utilizados	43
2. Medios de cultivo y soluciones de uso frecuente	44
3. Líneas celulares	45
a. Líneas humanas ( <i>Homo sapiens</i> ) de cáncer de mama de diferente agresividad	45
b. Línea de glioma de rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	46
4. Cultivo Primario de Astroцитos de Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	47
5. Plásmidos utilizados	48
a. Vector reportero pNL1.1	48
b. Vector de expresión de ARN pequeño de interferencia pSUPER.retro.puro	49
c. Vector de expresión pSG5	50
6. Digestión con endonucleasas de restricción	51
7. Electroforesis en geles de agarosa	51
8. Purificación de fragmentos de ADN	51
9. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación	52
10. Cepa bacteriana	52
a. Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes	53
b. Transformación de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes	53
11. Aislamiento y Purificación de ADN plasmídico	53
a. Pequeña escala	53
b. Mediana escala	54
12. Cebadores utilizados	55



<b>13. Clonado del promotor humano de ACSL4 de 1,8 kb en el vector pNL1.1</b>	<b>56</b>
<b>14. Construcción de deleciones unidireccionales progresivas a partir del promotor de 1,8 kb</b>	<b>56</b>
a. Amplificación por PCR de alta fidelidad con la enzima Pfu DNA Polimerasa	56
b. Construcción de deleciones unidireccionales progresivas 5´	57
c. Construcción de deleciones unidireccionales progresivas 3´	58
d. Clonado dedelecciones unidireccionales progresivasdel promotor humano de ACSL4 en el vector pNL1.1	60
<b>15. Análisis Bioinformática</b>	<b>60</b>
<b>16. Mutación sitio-dirigida</b>	<b>61</b>
<b>17. Secuenciación del ADN plasmídico</b>	<b>62</b>
<b>18. Transfección de líneas celulares</b>	<b>62</b>
a. Transfección transitoria	62
b. Transfección estable	63
<b>19. Determinación de la actividad de luciferasa</b>	<b>64</b>
<b>20. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)</b>	<b>65</b>
<b>21. Obtención de lisados totales</b>	<b>68</b>
<b>22. Obtención de fracción mitocondrial (fraccionamiento subcelular)</b>	<b>68</b>
<b>23. Análisis de proteínas</b>	<b>68</b>
a. Cuantificación de proteínas	68
b. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	68
c. Western blot	69
d. Inmunocitoquímica de fluorescencia	70
<b>24. Análisis de ARN</b>	<b>71</b>
a. Obtención de ARN total	71
b. Tratamiento del ARN con desoxirribonucleasa I (ADNasa I)	72
c. Reacción de transcripción reversa (RT)	72
d. PCR semicuantitativa	73

e. PCR cuantitativa en tiempo real	74
25. Determinación de la concentración de progesterona en medio de cultivo	76
a. Extracción de progesterona del medio de cultivo	76
b. Cuantificación de progesterona en los extractos por la técnica de RIA	76
26. Ensayo de migración celular	76
27. Ensayos de proliferación celular	77
a. Ensayo de MTT	77
b. Ensayo de incorporación de Bromo deoxiuridina (BrdU)	77
28. Análisis estadístico	78
 RESULTADOS	 79
 A. Caracterización funcional del promotor humano de ACSL4 en líneas de cáncer de mama	 80
A.1. Clonado, análisis y funcionalidad de la secuencia del promotor de ACSL4 humano	80
A.2. Análisis de la actividad de delecciones unidireccionales 5' del promotor	83
A.3. Análisis de la actividad de delecciones unidireccionales 3' del promotor	86
A.4. Análisis Bioinformático	89
A.5. Funcionalidad de las secuencias consenso para ROR $\alpha$ , Sp1, ERR $\alpha$ y la familia E2F en la regulación del promotor humano de ACSL4	92
A.6. Interacción del factor de transcripción ERR $\alpha$ con el promotor humano de ACSL4 en la línea MDA-MB-231	98
A.7. Efecto de la inhibición de ERR $\alpha$ en la actividad transcripcional y en la expresión de ACSL4	100
A.8. Efecto de la inhibición conjunta de ACSL4 y ERR $\alpha$ sobre la proliferación de la línea MDA-MB-231	101
A.9. Efecto de la restauración de la expresión del Receptor de Estrógenos sobre la expresión de ACSL4	102
B. Regulación y función de AcsL4 en células neuroesteroideogénicas	104
B.1. Expresión ACSL4 en astrocitos y su regulación por 8Br-AMPC	104

<b>B.2. Regulación de la expresión del ARNm de StAR en células de la glía</b>	106
<b>B.3. Rol de ACSL4 en la neuroesteroidogénesis en astrocitos de rata</b>	107
<b>B.4. Rol de ACSL4 en la migración y proliferación en células de la glía</b>	108
 <b>DISCUSIÓN</b>	 115
 <b>A. Regulación transcripcional de ACSL4 en líneas de cáncer de mama humano</b>	 115
<b>B. Regulación y función de ACSL4 en células neuroesteroidogénicas</b>	124
 <b>CONCLUSIONES</b>	 130
 <b>REFERENCIAS</b>	 140

# *Introducción*

La visión tradicional de que los lípidos suelen actuar solamente como unidades en la construcción de la membrana o combustibles ha cambiado en los últimos años. Actualmente, es ampliamente aceptado que estas biomoléculas están involucradas en transducción de señales, y que los desequilibrios en el metabolismo de lípidos son causantes de una serie de trastornos de alta prevalencia, que van desde la enfermedad cardiovascular, la diabetes, la obesidad y el cáncer. Dentro de los lípidos más estudiados en estos aspectos se encuentra el ácido araquidónico. El control de la homeostasis del ácido araquidónico en el medio intracelular es de suma importancia debido a las funciones que cumplen tanto esta molécula como sus metabolitos, los eicosanoides. En nuestro laboratorio se ha descrito la liberación de ácido araquidónico al interior de la mitocondria a través de un mecanismo que involucra a la enzima Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) como un paso fundamental en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis. Los cambios en los niveles intracelulares del ácido araquidónico o de sus metabolitos impactan en la regulación de la esteroidogénesis modulando de forma indirecta las respuestas de células diana a las diferentes hormonas esteroideas. En este trabajo de tesis estudiaremos por primera vez la regulación y función de la enzima ACSL4 en un modelo esteroidogénico no clásico.

Por otra parte, se ha observado que, en una variedad de procesos patológicos como por ejemplo en el cáncer de mama triple negativo, ocurre una desregulación en los niveles de ácido araquidónico (AA) y eicosanoides. En nuestro laboratorio hemos estudiado el rol que ejerce ACSL4 en la fisiopatología del cáncer de mama, vinculando la desregulación de los niveles de esta enzima con la agresividad tumoral. Es por esto que el estudio de la regulación de la expresión de ACSL4 aportará a la descripción de los mecanismos involucrados en el aumento de la expresión de la enzima en modelos de cáncer de mama triple negativo.

## **1. Acil-CoA Sintetasas y Acil-CoA Sintetasas de Cadena Larga**

Los ácidos grasos son moléculas de naturaleza lipídica formadas por una larga cadena hidrocarbonada de diferente longitud, en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. Constituyen una de las fuentes más importantes de energía en los mamíferos. Dada su naturaleza química, los ácidos grasos requieren ser activados antes de su entrada a una ruta metabólica. La activación consiste en la esterificación del ácido graso con Coenzima A (CoA) para formar un Acil-CoA [1]. Dado que los ácidos grasos son liposolubles, esta reacción permite retenerlos dentro de las células en forma de Acil-CoAs [1]. Los Acil-CoAs constituyen

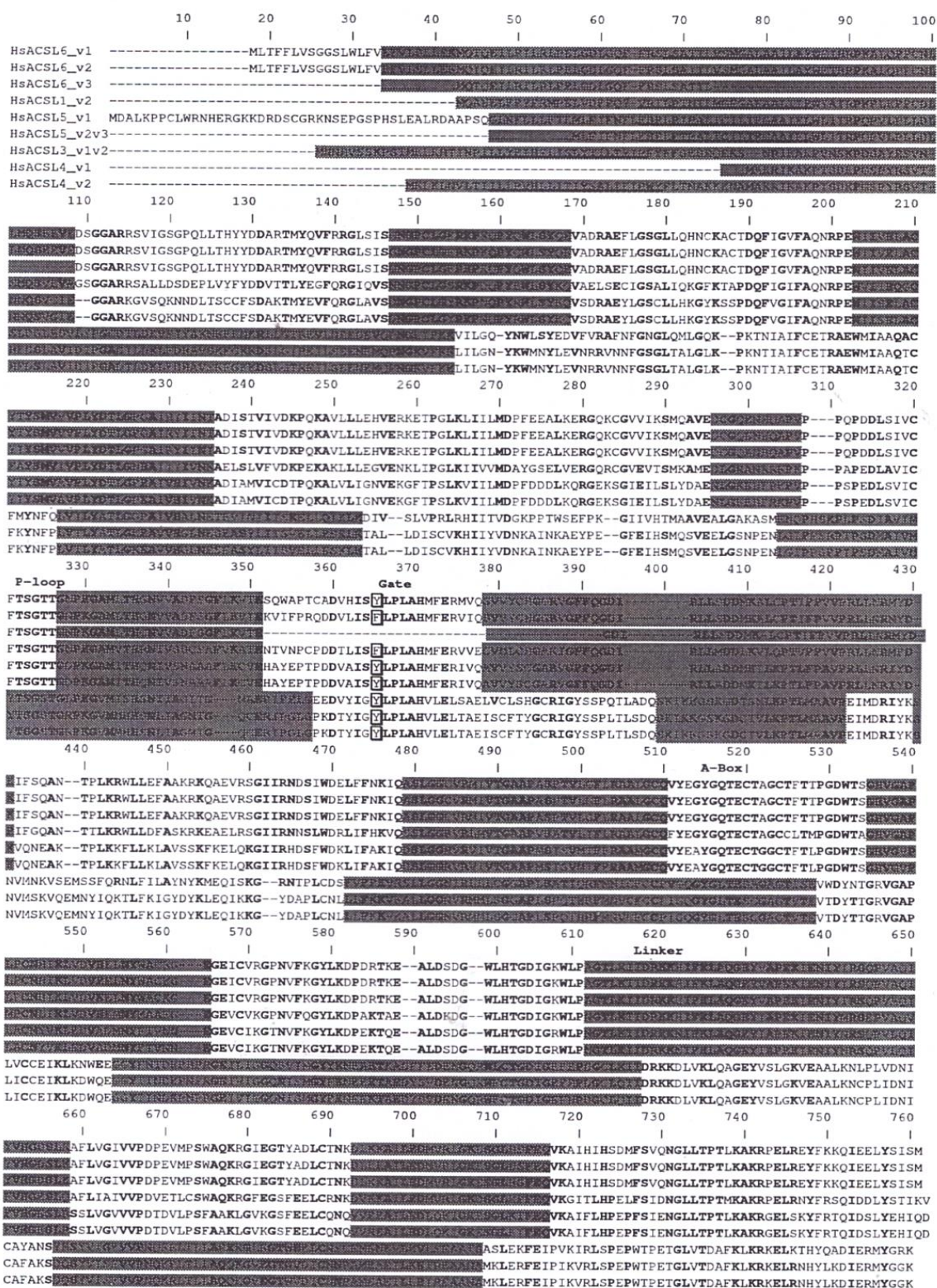
moléculas relevantes en variados procesos celulares de regulación y señalización [2, 3]. La reacción de formación de Acil-CoA es catalizada por los miembros de una familia enzimática denominada Acil-CoA Sintetasa (ACS). Teniendo en cuenta la longitud de la cadena carbonada de los ácidos grasos que utilizan como sustrato, las ACS se clasifican en subfamilias: Acil-CoA sintetasas de cadena muy larga (ACSVL), Acil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL), Acil-CoA sintetasas de cadena media (ACSM) y Acil-CoA sintetasas de cadena corta (ACSS) [4].

La subfamilia de las ACSL está integrada por enzimas que catalizan la activación de ácidos grasos saturados o insaturados de 12 a 20 átomos de carbono [4]. Estas proteínas juegan un papel esencial en diversos procesos tales como, la biosíntesis de lípidos, la degradación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación) y la remodelación de membranas. Se han identificado y caracterizado en roedores y humanos cinco miembros dentro de la subfamilia ACSL que difieren en sus preferencias de sustrato, cinética enzimática, regulación y ubicación subcelular y tisular [4]. Estas proteínas son codificadas por cinco genes diferentes y se denominan ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6.

Los cinco miembros de familia ACSL pueden dividirse en dos grupos basados en la homología de secuencia. En un grupo se encuentran ACSL1, ACSL5 y ACSL6 que muestran un 60% de homología en la secuencia aminoacídica y en el otro encontramos a ACSL3 y ACSL4 que muestran una homología del 68% entre sí (figura 1) [5-7]. Cada miembro de la familia ACSL posee diferentes variantes de ARNm producidas por corte y empalme alternativo del transcrito primario, que luego son traducidas generando varias isoformas.

## **2. Acil-CoA Sintetasa 4 (ACSL4)**

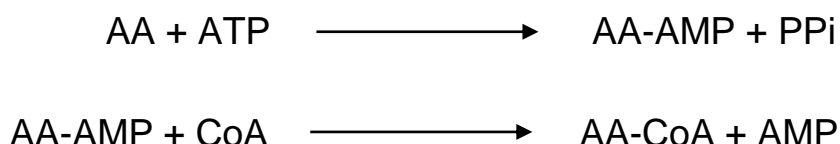
El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces cis en las posiciones 5, 8, 11 y 14. El AA es el precursor común de los eicosanoides, una familia de lípidos con un papel clave en la fisiología y fisiopatología [8, 9]. La actividad biológica de estas moléculas lipídicas obliga a las células a controlar rigurosamente los niveles de AA libre, de manera tal que la disponibilidad de este ácido graso es con frecuencia un paso limitante de la velocidad en la generación de eicosanoides.



**Figura 1. Estructura de las secuencias aminoacídicas de las ACSL humanas.** Se muestra la alineación de secuencias de los miembros de la familia ACSL humanas [5]. En cada isoforma los aminoácidos provenientes de los diferentes exones se esquematizan mediante la sucesión de bloques grises y sin color. Los residuos conservados se muestran en negrita.



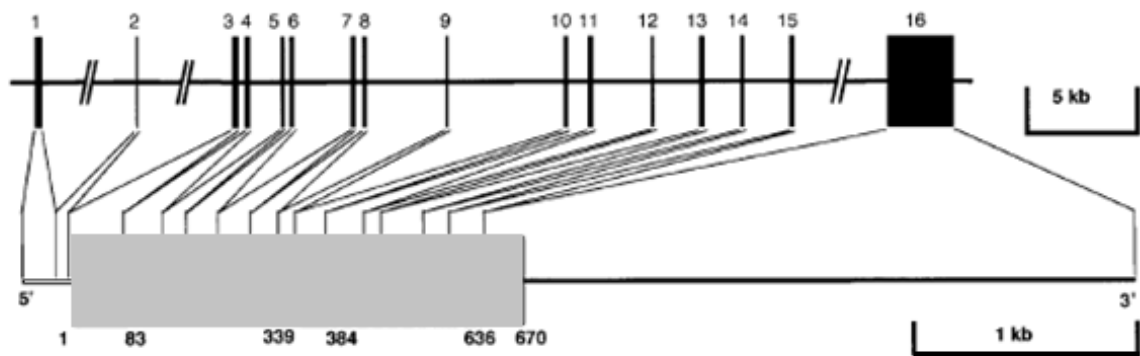
En contraste a lo observado para otros ácidos grasos, los niveles de AA libre en el citoplasma son bajos comparados con la cantidad de ésteres del mismo [10]. En el año 1985 se describió la presencia de una ACSL que utiliza preferentemente al AA como sustrato [11] a la que se denominó ACSL4. Posteriormente Kang y col. en 1997 describieron la estructura primaria, las propiedades enzimáticas y la expresión tisular de esta enzima [7]. Si bien comparte con ACSL3 la afinidad tanto por ácidos grasos 20:4 como 20:5, su preferencia por el AA revela su relevancia para el control de los niveles intracelulares de AA libre. La producción de Acil-CoA a partir de AA, catalizada por ACSL4, requiere la utilización de una molécula de ATP. La reacción involucra la formación de un intermediario AA-AMP y luego se produce el intercambio de AMP por CoA para producir Araquidonil-CoA (AA-CoA) activado. De esta forma se activa el AA para que pueda participar en reacciones metabólicas. En síntesis, los dos pasos de reacción que se llevan a cabo son los siguientes:



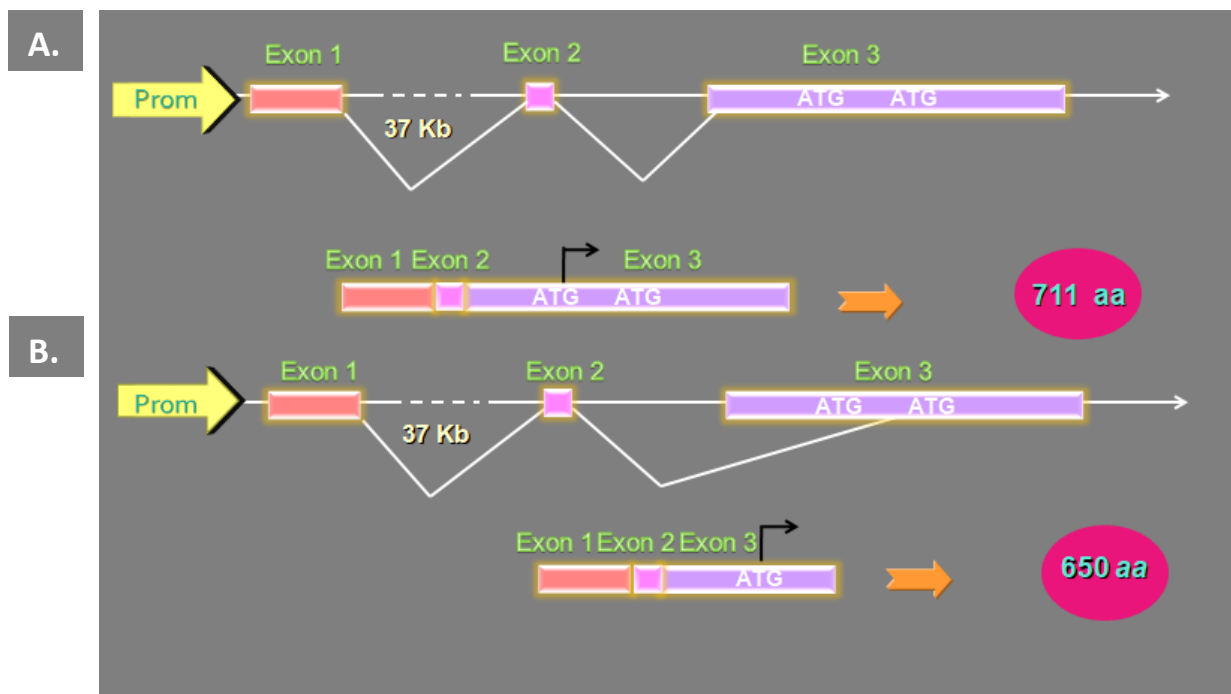
El gen que codifica a ACSL4 humana se encuentra en la región Xq22.3-q23 del cromosoma X. Comprende una longitud de 90 kb y contiene 16 exones separados por 15 intrones (figura 2) [12].

El primer intrón es el más largo y comprende 37 kb. La región 5'-UTR se transcribe a partir de la secuencia de los exones 1 y 2 y parte del exón 3. El tercer exón contiene dos codones de inicio ATG en el mismo marco de lectura. El primer ATG (ATG<sub>1</sub>) es el codón de inicio para la isoforma larga de ACSL4 humana que consta de 711 aminoácidos (80 kDa) (ACSL4\_v2). El ATG<sub>1</sub> puede ser removido por un sitio aceptor de empalme alternativo presente entre los dos ATGs. En ese caso, el segundo ATG (ATG<sub>2</sub>) marca el inicio de la traducción la isoforma corta (ACSL4\_v1) que consta de 670 aminoácidos (75 kDa) (figura 3) [4].





**Figura. 2. Estructura del gen de ACSL4 y de la variante de 670 aminoácidos.** En la parte superior de la figura se esquematiza la hebra de ADN que contiene el gen de ACSL4 humano. En rectángulos negros numerados se esquematizan a los 16 exones del mismo separado por intrones representados por líneas negras horizontales. En la parte inferior se esquematiza el transcripto de la variante corta, en donde el rectángulo gris indica la secuencia codificante. En sus extremos las líneas negras horizontales corresponden a las zonas 5' UTR y 3' UTR. A la derecha se indica una referencia de longitud en kb. (La imagen fue modificada a partir de una figura de Minekura y col. 2001 [12]).



**Figura 3. Esquema de las variantes humanas de ARNm de ACSL4 descritas.** (A) corresponde a ACSL4\_v2 que codifica para la isoforma larga y (B) corresponde a ACSL4\_v1 que codifica para la isoforma corta.

La estructura tridimensional de ACSL4 de mamíferos aún no se ha descrito. A través de la comparación de la secuencia con una ACSL de origen bacteriano cuya estructura ha sido determinada, se infiere que ACSL4 humana contiene un dominio conservado que determina la especificidad de sustrato [13, 14].

ACSL4 es una proteína que se expresa preferencialmente en varios tejidos tales como: glándula adrenal, epidídimo, cerebro, pulmón, ovario, placenta, hígado y testículos [7, 15, 16]. Es notable su abundancia en células esteroideogénicas, especialmente en células de la *zona fasciculata* y *reticularis* de la glándula adrenal, células de Leydig del testículo y en células del cuerpo lúteo y del estroma del ovario [7, 15]. En cuanto a su ubicación subcelular, ACSL4 se encontró en peroxisomas y microsomas y posteriormente se estableció su localización en membranas asociadas a mitocondrias (MAMs). Las MAMs constituyen un subdominio especializado del retículo endoplásmico que actúa como un centro de señalización intracelular [17, 18]. Las MAMs están altamente enriquecidas en ACSL4 [18, 19] y esta enzima ha sido descrita como un marcador específico de estas estructuras [20].

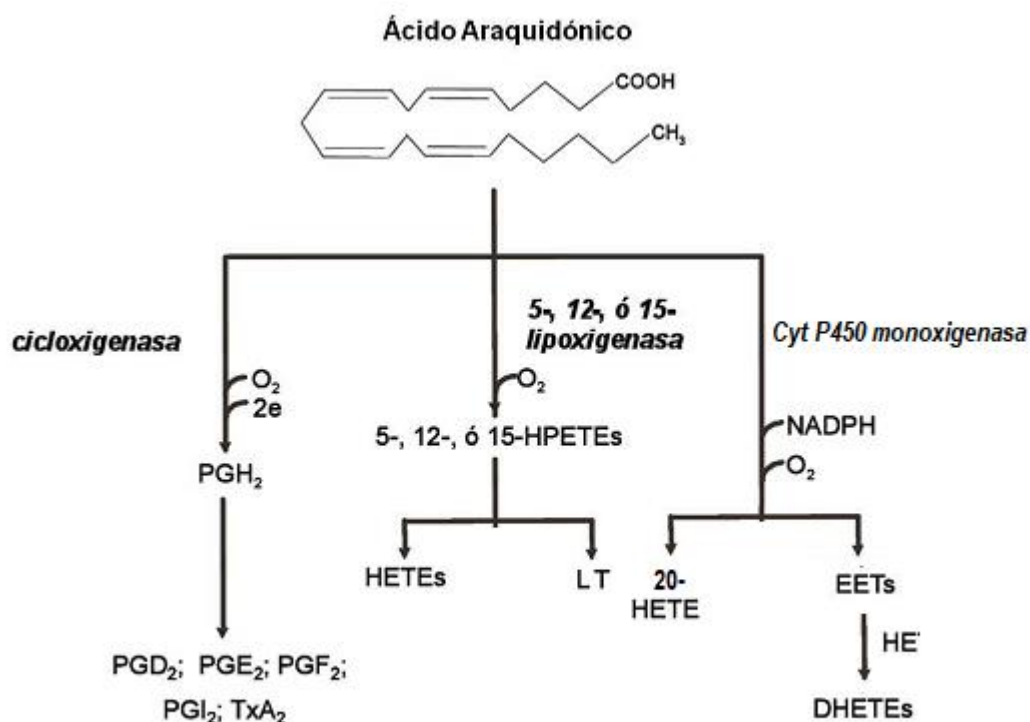
La expresión de la enzima ACSL4 se describió en estadios tempranos del desarrollo en el cerebro de ratón, detectándose una cantidad significativa de su ARNm en embriones en estadio E7 [16]. ACSL4 también se expresa en el cerebro de ratones neonatos y adultos, especialmente en células granulares del giro dentular, astrocitos, neuronas piramidales de la capa hipocámpal CA1 y capa de células granulares y células de Purkinje del cerebelo entre otros tipos celulares [16, 21].

### 3. Rol de ACSL4 en el metabolismo del ácido araquidónico

Tanto el AA como sus metabolitos son biológicamente importantes debido a sus actividades como segundos mensajeros, sus funciones estructurales de membrana, su implicancia en la inflamación, la esteroideogénesis, la vasodilatación, la apoptosis, la proliferación y otras respuestas celulares [22-26].

Al AA se lo considera un segundo mensajero dado que puede mimetizar la acción del agonista u hormona que desencadenó su liberación [27]. Esta acción puede ser directa [28, 29] o a través de sus metabolitos. Los metabolitos del AA se denominan eicosanoides y se producen en una amplia variedad de tejidos de diferentes especies animales [22, 30]. Son generados por las enzimas lipooxigenasas, ciclooxigenasas y epooxigenasas que provocan la conversión del AA en leucotrienos (LTs) y ciertos ácidos hidroxilados, prostaglandinas y tromboxanos o epoxiácidos respectivamente (figura 4) [22]. Los ácidos hidroxilados derivados

de la LOX son los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos. Hay al menos tres LOX que agregan un grupo hidropoxi (-OOH) a la posición 5, 12 o 15 del AA para producir ácido 5-, 12- ó 15-hidropoxieicosatetraenoico (HPETE) que son inestables. Estas moléculas se convierten rápidamente a 5-, 12- o 15-ácido hidroxi-eicosatetraenoico (HETE). El 5-HPETE también se puede convertir en LTs [22].



**Figura 4. Metabolismo del AA.** En la figura se señalan las enzimas y los principales metabolitos del AA. Referencias: PG: prostaglandina; Tx: tromboxano; LT: leucotrieno; HPETE: ácido hidropoxieicosatetraenoico; HETE: ácido hidroxi-eicosatetraenoico; EET: ácido epoxieicosatrienoico; DHETE: ácido dihidroxi-eicosatetraenoico. HE: hidrolasa de epóxido soluble.

Los eicosanoides pueden actuar localmente como ligando de receptores acoplados a proteína G. También se ha encontrado que el 12-HETE media la producción de aldosterona inducida por Angiotensina II (ANG II) aumentando los niveles de calcio citosólico y las actividades de proteína quinasa C (PKC) y P38 Mitogen Activated Protein Kinases (p38 MAPK) [22, 31-36].

Dado que, como se ha mencionado anteriormente, el AA posee actividades biológicas relevantes resulta fundamental el control riguroso de sus niveles intracelulares, de manera tal

que la disponibilidad de este ácido graso es con frecuencia un paso limitante de la velocidad en la generación de eicosanoides [37].

ACSL4 juega un rol importante como regulador de los niveles de AA intracelulares y la síntesis de eicosanoides [38] y por ende su actividad impacta sobre las diferentes funciones en las que los mismos están involucrados. Un ejemplo que muestra esta implicancia se observó en el músculo liso de las arterias humanas, donde la disminución de la expresión de ACSL4 lleva a una reducción marcada de la liberación y secreción de la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) y por ende afecta la proliferación celular del músculo liso, la liberación de mediadores inflamatorios y otros procesos de la pared vascular [39].

#### **4. Rol de ACSL4 en la regulación de la esteroidogénesis**

##### **4.1. Generalidades sobre la esteroidogénesis**

Se denomina esteroidogénesis al conjunto de reacciones metabólicas que generan como producto hormonas esteroides derivadas del colesterol [40]. La esteroidogénesis se produce en tejidos especializados, que poseen la batería enzimática necesaria para llevar a cabo dicho proceso. Los principales tejidos esteroidogénicos son la corteza adrenal, gónadas y placenta. Más allá de los tejidos clásicos mencionados, se ha demostrado que el sistema nervioso (SN) también tiene la capacidad de sintetizar hormonas esteroides que se denominan neuroesteroides [41-43].

Los tejidos esteroidogénicos sintetizan y liberan hormonas esteroides que ejercen su función en células diana en general alejadas de su lugar de síntesis. Algunas de las principales funciones de las hormonas esteroides son: el mantenimiento del equilibrio hídrico, la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, la modulación del sistema inmune, el desarrollo de órganos sexuales secundarios, la diferenciación sexual y la reproducción.

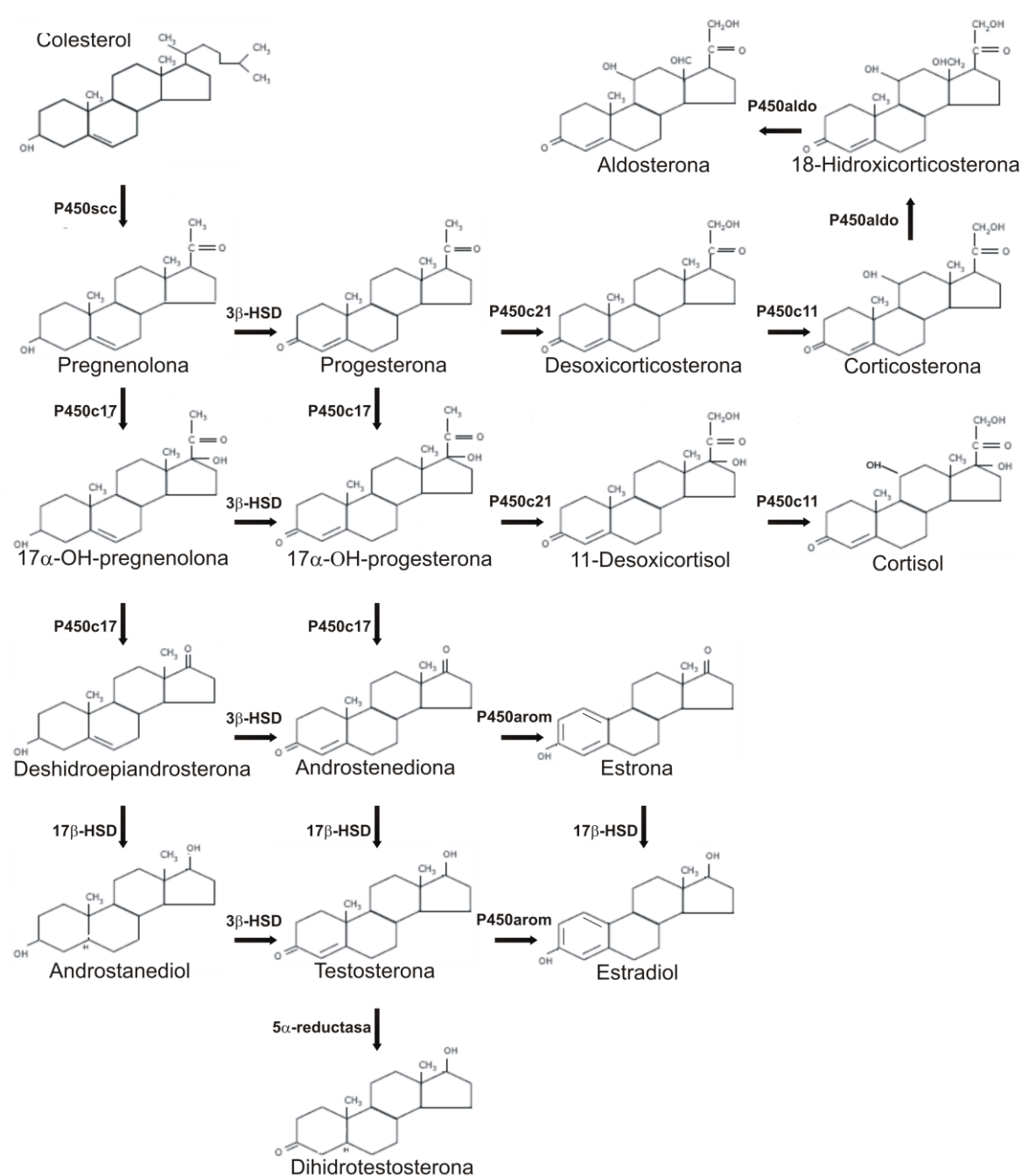
Cada tejido esteroidogénico se especializa en la producción de determinadas hormonas esteroides en base a las enzimas específicas presentes en dicho tejido. Por ejemplo, la glándula adrenal que regula el equilibrio hídrico y el metabolismo de hidratos de carbono produce principalmente dos grupos de hormonas esteroides: los glucocorticoides y los mineralocorticoides de los cuales las hormonas principales son el cortisol y la aldosterona respectivamente. En células de Leydig de testículo, el andrógeno más importante que se sintetiza es la testosterona. El cuerpo lúteo del ovario sintetiza y secreta diferentes niveles de estrona, estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (P4) dependiendo de la fase del ciclo sexual femenino. La placenta sintetiza altísimas cantidades de estrógenos y P4 durante el embarazo. En

gónadas y glándulas suprarrenales P4 es un intermediario en la síntesis de todos los esteroides que producen estos tejidos.

#### 4.2. Biosíntesis de hormonas esteroides

La ruta biosintética de las hormonas esteroides a partir de colesterol en vertebrados se esquematiza en la figura 5. En este proceso el colesterol disponible dentro de la célula debe transportarse a la mitocondria donde comienza la esteroidogénesis. El colesterol celular puede provenir de una vía exógena en la cual las lipoproteínas que transportan el colesterol de la dieta son captadas por las células desde el torrente sanguíneo [40, 44, 45]. También el colesterol celular puede provenir de una vía endógena en la cual las células sintetizan el colesterol *de novo* a partir de acetato [40]. El colesterol se almacena en depósitos en forma de gotas lipídicas esterificado con ácidos grasos. Cuando se induce la síntesis de esteroides, el colesterol almacenado se moviliza a partir de estos depósitos.

La conversión de colesterol a pregnenolona (P5), un esteroide de 21 carbonos, comprende la primera etapa de la vía de síntesis de esteroides. En esta etapa se escinde la cadena lateral del colesterol y se generan dos hidroxilaciones sucesivas en los carbonos C20 y C22. El complejo enzimático que lleva a cabo estas reacciones se localiza en la membrana mitocondrial interna y se denomina complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol citocromo P450 (P450<sub>scc</sub>) [46, 47]. A partir de P5 se sintetiza el resto de las hormonas esteroides en la mitocondria y el retículo endoplásmico mediante sucesivas oxidaciones y reducciones o isomerizaciones catalizadas enzimáticamente (figura 5). La síntesis diferencial de esteroides en los distintos tejidos esteroidogénicos se debe a la expresión tisular específica de distintas enzimas que utilizan como sustrato P5. Debido a esto cada tejido esteroidogénico se especializa en sintetizar ciertas hormonas esteroides.



**Figura 5. Esquema de las vías de biosíntesis de hormonas esteroideas.** 3β-HSD, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; p450c21, 21-hidroxilasa; p450c11, 11β-hidroxilasa; p450aldo, 18-hidroxilasa, 18-oxidasa; p450c17, 17α-hidroxilasa; p450arom, aromatasa; 17β-HSD, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

### 4.3. Regulación hormonal de la esteroidogénesis

Las hormonas tróficas estimulan la producción de hormonas esteroides en diferentes tejidos [40]. Es así como en células de Leydig la producción de testosterona es estimulada por la hormona luteinizante (LH). En el ovario distintos pulsos de LH y la hormona folículo estimulante (FSH) determinan las diferencias en la producción de estrógenos y P4 a lo largo del ciclo menstrual. La Gonadotrofina Coriónica Placentaria (GC) liberada por el trofoblasto de la placenta, actúa sobre el cuerpo lúteo del ovario para que no se desintegre y sintetice altas cantidades de P4. Si bien la placenta no tiene un sistema completo para la síntesis de esteroides, el feto y la madre aportan los precursores para la producción de estrógenos y P4, los esteroides mayoritarios sintetizados por este tejido. En la corteza suprarrenal la adrenocorticotropina (ACTH) modula la producción de mineralocorticoides y glucocorticoides.

Las hormonas peptídicas ACTH, LH, FSH y GC son hormonas sintetizadas en la *pars distalis* de la adenohipófisis. Todas ellas actúan en su tejido blanco mediante la activación de sus receptores específicos de membrana plasmática acoplados a proteína Gs. Posteriormente, se produce la activación de la adenil ciclasa (AC) que genera el incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc). Este segundo mensajero activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) [48-50]. La PKA activada conduce a la fosforilación de proteínas regulatorias de la esteroidogénesis y como resultado final se obtiene un incremento de la síntesis de hormonas esteroides [40].

El incremento de los niveles intracelulares de AMPc por acción de las hormonas tróficas sobre sus respectivas células blanco produce tanto efectos agudos como crónicos. En la fase aguda de la esteroidogénesis el nivel de expresión de las enzimas esteroidogénicas permanece constante. En cambio los efectos crónicos se caracterizan por la inducción de la transcripción de genes que codifican a las enzimas esteroidogénicas [40].

Como ya se ha dicho, las hormonas esteroides se sintetizan a partir de colesterol. El sitio activo del complejo P450<sub>scc</sub> se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. El paso limitante de la esteroidogénesis es el acceso del colesterol libre desde la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna y no la actividad enzimática de P450<sub>scc</sub> en sí misma [40, 46, 51, 52]. Por lo tanto, el transporte de colesterol es el primer paso en la vía de síntesis de hormonas esteroides. Este evento es regulado por acción hormonal [40, 46, 47, 53, 54] y es mediado por la señalización de AMPc. En términos generales, el colesterol celular que reside en el exterior de la membrana mitocondrial debe pasar a la membrana mitocondrial interna, para llegar al sitio activo de P450<sub>scc</sub> que convierte

el colesterol a P5 en todos los tejidos esteroideogénicos. Este transporte de colesterol requiere de la síntesis *de novo* de proteínas [40, 55].

Se ha caracterizado en células esteroideogénicas una fosfoproteína inducida por el estímulo hormonal que se ha denominado Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) [40, 56-61]. Esta proteína interviene en la transferencia de colesterol del espacio externo al interior de la mitocondria participando en el paso limitante de la esteroideogénesis [40, 51, 55, 62-64]. StAR se sintetiza *de novo* en el citosol frente al estímulo hormonal [40, 55] y es importada a la mitocondria. El precursor de StAR de 37 kDa presenta en su extremo amino terminal una secuencia de localización mitocondrial que lo direcciona a esta organela [40, 51]. El propio colesterol regula la conformación de StAR, manteniéndola en un estado intermedio flexible durante la importación mitocondrial y su inducción [65]. La estimulación hormonal en células esteroideogénicas activa un clivaje proteolítico secuencial sobre el precursor de StAR que genera una proteína madura de 30 kDa [40, 51]. La región C-terminal de StAR contiene un dominio de transferencia de lípidos denominado START, el cual estaría involucrado en la transferencia del colesterol [51]. Este dominio es biológicamente activo y contiene una hendidura hidrofóbica donde podría unirse el colesterol. Otras proteínas involucradas en el transporte de lípidos y esteroides también contienen al dominio START [51]. La entrega de colesterol al complejo enzimático P450<sub>scc</sub> finaliza con la escisión del dominio N-terminal de StAR [51].

La expresión de StAR está regulada hormonalmente tanto a nivel traduccional como transcripcional en la fase aguda y crónica. La activación de la esteroideogénesis por las hormonas tróficas promueven tanto el incremento del ARNm de StAR como la síntesis y fosforilación de la proteína [66, 67]. En la fase aguda no hay inducción de la transcripción, pero sí existe síntesis *de novo* de StAR. En la fase crónica, se induce la transcripción del gen de StAR. Existe también inducción de la esteroideogénesis a través de un mecanismo independiente de la vía de PKA en ausencia de fosforilación de StAR, pero es minoritario y en él podría intervenir la activación de PKC. Además se conoce en parte que las Mitogen Activated Protein kinases (MAPKs), en particular ERK1/2, juegan un rol importante tanto en la inducción de StAR como en su regulación post-traduccional [68, 69].

La evidencia más fuerte respecto del requerimiento de StAR en la esteroideogénesis, es el hallazgo de mutaciones en la secuencia nucleotídica del gen de StAR que son la causa de una condición potencialmente letal conocida como hiperplasia suprarrenal lipóide congénita [40, 51, 70, 71]. Esta enfermedad se caracteriza por un bloqueo casi completo de la síntesis de hormonas esteroideas. Los individuos portadores son incapaces de sintetizar cantidades suficientes de esteroideas, contienen excesivos niveles de colesterol y ésteres de colesterol en



las células esteroideogénicas de la glándula adrenal y el testículo, y no pueden sobrevivir sin una terapia hormonal de reemplazo [70]. Se han generado ratones *knockout* para StAR y su fenotipo es esencialmente idéntico al visto en la condición humana, demostrando aún más el papel conservado de StAR entre especies en la esteroideogénesis [40, 72].

#### 4.4. Rol del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroideogénesis

Está ampliamente descrito que la estimulación hormonal de la síntesis de esteroides en la corteza adrenal y en las células testiculares de Leydig implica el incremento de los niveles de AA. En las células de Leydig, el AA se libera luego de un minuto de la estimulación con LH [40, 73, 74]. La liberación de AA ocurre en forma dependiente de la dosis y del tiempo en células de Leydig estimuladas con GC [74] y en células suprarrenales estimuladas con ACTH [75]. La inhibición de la liberación de AA deja sin efecto la acción de LH y ACTH sobre la producción de esteroides determinando que es un evento necesario para la esteroideogénesis [76-78].

Se demostró que metabolitos del AA están involucrados en la regulación de la esteroideogénesis. Por ejemplo, en las células de la zona fasciculata de la corteza de la glándula adrenal, se demostró un efecto directo de los metabolitos 15-lipoxigenados en la regulación de la síntesis de P5 [79]. De hecho, el tejido adrenocortical posee las vías 5-LOX y 15-LOX que generan 5-HETE y 15-HETE respectivamente a partir de AA [80]. En células de Leydig se demostró que 5-HPETE ó 5-HETE están involucrados en el incremento de la producción de P4 [81].

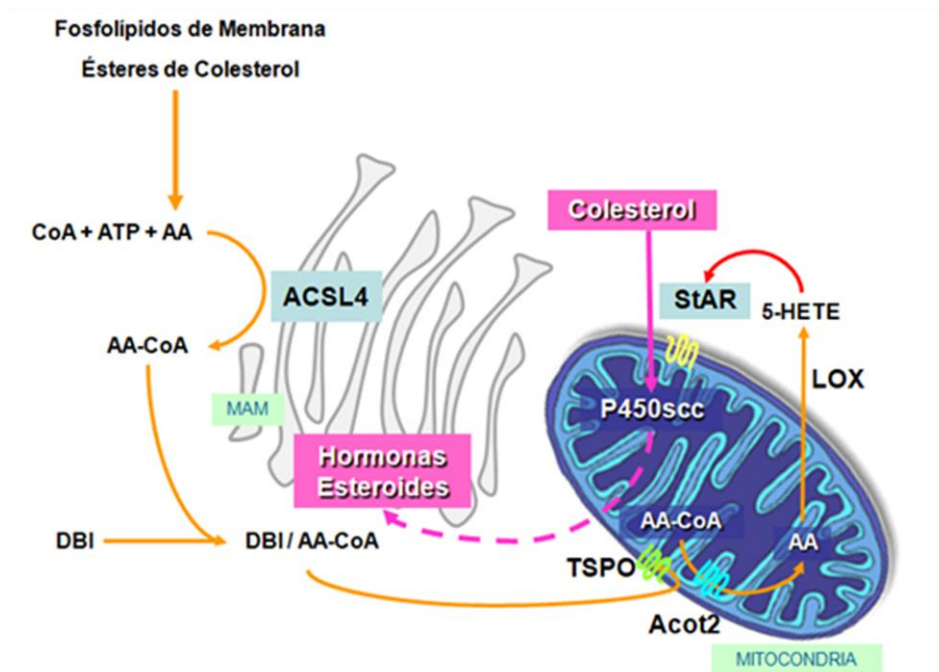
Se ha determinado que el AA y sus metabolitos juegan un papel en la regulación de la expresión de StAR ya que en la fase aguda de la síntesis de esteroides, la liberación de AA en la mitocondria es el primer estímulo para el transporte de colesterol [69, 82]. En células de Leydig los metabolitos de AA producidos por 5-LOX están involucrados en la señalización inducida por hormonas tróficas y son activadores de la expresión génica de StAR. El elemento de respuesta al AA reside en la región comprendida entre las bases -67/-96 del promotor StAR [81]. Se ha descrito en células de Leydig que metabolitos de la epoxigenasa [83] tienen un efecto regulatorio sobre la expresión del gen de StAR y la esteroideogénesis.

#### 4.5. Expresión y función de ACSL4 en tejidos esteroideogénicos

Durante algunos años se pensó que la fosfolipasa A2 (PLA2) estaba involucrada en la liberación de AA regulada por hormonas tróficas [22]. Sin embargo, no hay evidencia directa que demuestre que PLA2 libere AA en tejidos esteroideogénicos, ni de que las hormonas esteroideogénicas activen a PLA2. Estas observaciones sugirieron que otro tipo de mecanismo de liberación de AA debería operar en la regulación de la biosíntesis de esteroides desencadenada por hormonas tróficas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito un mecanismo de liberación de AA en el que opera ACSL4 [15, 84-86]. En este mecanismo regulado hormonalmente está involucrada ACSL4 la cual secuestra a este ácido graso del pool libre citosólico para esterificarlo a AA-CoA [7, 86]. Posteriormente interviene una acil-CoA tioesterasa denominada Acot 2 que se localiza en la membrana mitocondrial interna [15, 84-88]. Acot 2 pertenece a una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de diversos ésteres de CoA a ácido libre más CoA [89, 90]. En consecuencia, estas enzimas tienen implicancia sobre la regulación de los niveles intracelulares de esas moléculas y por ende en los procesos celulares que involucran a estos compuestos. En la membrana mitocondrial Acot 2 hidroliza AA-CoA liberando los productos AA y CoA en el interior de la mitocondria [15]. Se ha demostrado que tanto el silenciamiento de la expresión de Acot 2 como de ACSL4 inhiben la producción de esteroides y la expresión de StAR [15, 86]. Estos efectos se revierten por el agregado de AA o derivados permeables del colesterol, pero no por agregado de otros ácidos grasos, indicando que ACSL4 está involucrada específicamente en este mecanismo. También se demostró, que el inhibidor de ACSL4 Triacsina C, inhibe la esteroideogénesis estimulada por AMPc y la expresión de StAR [86]. En este mecanismo el AA-CoA sería transportado hacia la mitocondria unido al inhibidor de unión al diazepam (DBI) [64, 91, 92], una proteína de unión a acil-CoA que se expresa en altas concentraciones en células esteroideogénicas [93-95]. La proteína DBI es ligando de Translocator Protein (TSPO) localizada en la membrana mitocondrial externa [96-98]. Esto posiblemente facilitaría la transferencia de AA-CoA a las mitocondrias con la consecuente disponibilidad del sustrato para Acot 2 en su sitio de acción [15, 84, 86-88, 99-101]. Estos estudios fueron los primeros en proporcionar evidencia de una vía alternativa de generación de AA que involucra a ACSL4/Acot 2 y que compartimentaliza al AA y AA-CoA [15, 84-86, 102]. Todos estos resultados establecen un rol coordinado entre ACSL4 y Acot2 ante el estímulo trófico que genera la liberación de AA en el interior de la mitocondria y la inducción de la expresión de StAR estimulando así la síntesis de hormonas esteroides. En la figura 6 se muestra un esquema del modelo de liberación del AA en el cual se involucra a ACSL4.

## 5. Otras funciones de ACSL4

Recientemente se ha encontrado que ACSL4 está involucrada en una nueva forma de muerte celular regulada, la ferroptosis. Se trata de una necrosis regulada por la enzima Glutathion peroxidasa 4. Se caracteriza morfológicamente por la presencia de mitocondrias más pequeñas que lo normal, membrana mitocondrial condensada, reducción o desaparición de las crestas mitocondriales y ruptura de la membrana mitocondrial externa. Puede ser inducida por compuestos experimentales (erastina, pequeña molécula letal Ras-selectiva 3, butionina sulfoximina), o por drogas clínicas (sulfasalazina, sorafenib, artesunat) en células tumorales y en algunas células normales (p.e., células tubulares del nefrón, neuronas, fibroblastos, linfocitos T).

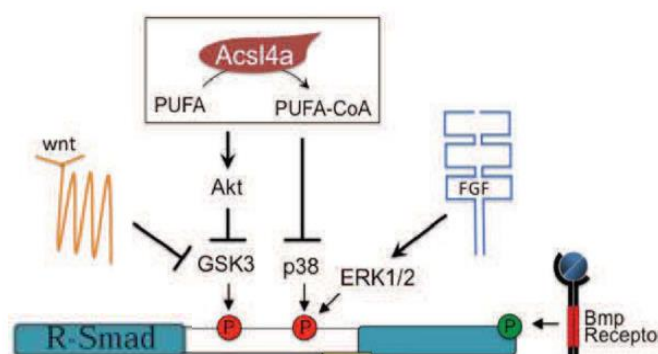


**Figura 6. Modelo de liberación de AA al interior de la mitocondria y su relación con la esteroidogénesis.** Esquema tomado y modificado de "ACSL4" Maloberti P.M., Castillo A.F., Orlando U., Podesta E.J. (2016). Choi S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, New York, NY [103].

La desregulación de la ferroptosis está implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la muerte de células tumorales, neurotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, hepatotoxicidad inducida por drogas, fallas renales agudas, lesión por isquemia/reperfusión hepática y miocárdica entre otras [104]. A través de distintos enfoques

experimentales desarrollados en líneas celulares resistentes a la ferroptosis, se demostró que ACSL4 es un componente esencial para la ejecución de este mecanismo. Se ha observado que la inhibición farmacológica de ACSL4, atenúa la muerte tisular en un modelo de ferroptosis murino. [105-107].

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y sus metabolitos juegan un rol importante en el desarrollo embrionario. Se demostró que *Acsl4a*, enzima homóloga a ACSL4 humana, es esencial para la formación del patrón dorsoventral en el desarrollo de *zebrafish* [108]. Este patrón requiere de un gradiente temporal de Proteínas Morfogénicas del Hueso (Bmp), las cuales son miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento TGF- $\beta$ . Los Bmp son ligandos de receptores Serina/Treonina quinasa los cuales regulan a los factores de transcripción dependientes de Smad (R-Smad) que a su vez regulan la transcripción de genes dependientes de Bmp. Los R-Smad pueden ser regulados también por otras vías de señalización diferentes que influyen en la embriogénesis. Miyares y colaboradores han demostrado que *Acsl4a* regula la actividad de R-Smad. La pérdida de ACSL4 durante el desarrollo en *zebrafish* afecta a la vía de Bmp e induce un fenotipo dorsalizado anormal [108]. El mecanismo molecular que subyace a este efecto mostró que *Acsl4a* promueve la estabilidad de R-Smad mediante la inhibición de su fosforilación dependiente de la p38 MAPK y a la glucógeno sintasa quinasa 3 dependiente de Akt (GSK3). Estos resultados revelan un rol crítico de *Acsl4a* en la modulación de la actividad de R-Smad y demuestra una potencial influencia de los ácidos grasos de cadena larga en una amplia variedad de procesos del desarrollo [108]. La figura 7 contiene un esquema que representa este mecanismo [108].



**Figura 7. Regulación de la actividad de R-Smad por Acsl4a y su relación con otras vías de señalización.** PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. PUFA-CoA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga-CoA. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos. Esquema obtenido del trabajo de Miyares y colaboradores 2013 [108].

## 6. Regulación hormonal de la expresión de ACSL4

En nuestro laboratorio se estudió ampliamente la regulación hormonal de ACSL4 en tejidos esteroideogénicos y su correlación con la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Se demostró que las hormonas tróficas ACTH y LH inducen rápidamente la expresión de ACSL4 en la corteza adrenal y en células de Leydig respectivamente a través de un mecanismo dependiente de AMPc [86]. En estos modelos se observó que estos estímulos también generan un aumento en los niveles de ARNm de ACSL4 en forma más tardía respecto de la inducción proteica [86].

En nuestro laboratorio también se han descrito mecanismos de inducción hormonal de ACSL4 independientes de AMPc. En células de Leydig MA-10 y adrenocorticales Y1 la expresión de ACSL4 se induce por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en un patrón bifásico [102]. Se ha evaluado también la inducción de esta proteína por ANG II en células adrenales de la zona glomerulosa [109]. Se observó un aumento tanto de la expresión como de los niveles de ARNm de ACSL4. El aumento de los niveles de ARNm muestra un perfil bifásico dependiente del tiempo [109]. En estas células se ha visto también que el estímulo que ejerce el potasio es idéntico al observado con ANG II [109]. Otros autores han estudiado la regulación de ACSL4 por glucocorticoides y se demostró que éstos inhiben la expresión de esta proteína [110].

Además, en nuestro laboratorio se ha caracterizado el rol de proteínas con actividad de tirosina fosfatasas (PTPs) sobre la esteroidogénesis [69, 109, 111-117]. Se ha observado que la inhibición de la actividad de PTPs produce una disminución en la expresión de ACSL4, teniendo también un efecto inhibitorio sobre la inducción de StAR y la esteroidogénesis [109, 118]. Se identificó a SHP2 (Tyrosine Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11) como una de las PTPs que están involucradas en la regulación de ACSL4, StAR y la esteroidogénesis en células de Leydig y en células adrenales [109, 116-118].

## 7. Regulación transcripcional de ACSL4

Con respecto a la regulación transcripcional de ACSL4 se han estudiado y descrito los promotores tanto del gen humano como del murino. A través de estos estudios se demostró la ausencia de secuencia típica u homóloga a la secuencia de la caja TATA en ambas especies dentro del promotor humano de ACSL4 [12, 119]. Los promotores que

carecen de caja TATA (80 % en mamíferos) son ricos en islas CG (CpG) [120] y el inicio de la transcripción puede ocurrir en varios lugares. Típicamente en estos promotores se extienden diferentes sitios de inicio de la transcripción (TSS) en una región de 50-100 pb [121]. El factor de transcripción Specificity Protein 1 (Sp1) juega un rol importante en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción en este tipo de promotores [122]. Este factor interactúa con componentes del complejo de preiniciación de la ARN Polimerasa II (ARN Pol II) y de esta manera actúa como activador de la transcripción génica [123]. En el promotor de ACSL4 se identificaron posibles elementos en cis para diferentes factores de transcripción. En las dos especies el estudio del promotor por análisis de bioinformática determinó la presencia de tres sitios potenciales de unión para Sp1 cercanos al extremo 3' [12, 119]. En el promotor de ratón, estos sitios se encuentran en las posiciones -64 y -111, dado que dos de ellos se hallan solapados en la posición distal [119]. Se determinó la presencia de secuencias ricas en CG con características de CpG cercanas a los TSS en ambas especies [12, 119]. En el promotor de ratón los diferentes TSS se localizaron en la región del exón 1 entre 220 a 118 bp río arriba del codón ATG<sub>1</sub> [119].

En el laboratorio se caracterizó el promotor de ACSL4 murino y se estudió su regulación hormonal en células esteroideogénicas. La actividad del promotor fue inducida tanto por tratamiento hormonal con GC y ACTH en células de Leydig y adrenocorticales respectivamente y se demostró que este efecto es mediado por el segundo mensajero AMPc. Mediante delecciones unidireccionales se demostró que los sitios necesarios para la transcripción basal y la inducida por AMPc se encuentran en un fragmento de 150 pb [119]. Otros autores habían determinado una longitud similar del promotor basal mínimo en el promotor humano [12]. Esta secuencia contiene los sitios consenso para los factores de transcripción Sp1 y CREB (cAMP response-element binding protein). El factor de transcripción CREB está asociado a la activación de genes inducidos por AMPc. En el promotor de ratón la mutación sitio dirigida de los sitios consenso para Sp1 produjo una disminución significativa de la actividad tanto basal como estimulada por 8Br-AMPc (un análogo permeable del segundo mensajero AMPc). En cambio, la mutación sitio dirigida de los sitios consenso para CREB redujo significativamente la estimulación mediada por AMPc sin afectar la actividad basal del promotor. Estos resultados permitieron concluir que Sp1 está involucrado en la transcripción basal de ACSL4 mientras que CREB está involucrado en la inducción de la transcripción de ACSL4 por AMPc. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), demostrando que efectivamente tanto Sp1 como fosfo-CREB se unen al promotor de ACSL4 y esta unión se incrementa por el tratamiento con AMPc. Estos resultados demostraron por primera vez el papel de Sp1 y CREB en la regulación de la transcripción del gen de ACSL4 [119].

## 8. Otros mecanismos de regulación de ACSL4

En la regulación de la expresión de ACSL4 también podrían estar implicadas modificaciones post-traduccionales tales como: la ubiquitinación y la fosforilación [124, 125]. Con respecto a este tema, en un trabajo reciente se demostró que el AA regula la estabilidad proteica de ACSL4 en hepatocitos por un mecanismo de ubiquitinación que disminuye los niveles de la enzima por degradación proteosómica [124].

Por otra parte, recientemente se ha demostrado la regulación de ACSL4 por diferentes microARN (miARN)s. Por ejemplo, se ha observado que mir34a regula la expresión de ACSL4 en células de cáncer de colon. Una mutación en el gen p53 produce la inhibición de la expresión de mir34a lo que lleva a que los genes regulados por este miARN aumenten su expresión [126].

## 9. Rol de ACSL4 en cáncer

### 9.1. Breves nociones sobre el cáncer

El proceso por el cual se genera un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular se denomina tumorigénesis. El resultado de este desequilibrio es una proliferación celular descontrolada que puede ser benigna o maligna y que se denomina neoplasia. Una neoplasia benigna es un tumor localizado, delimitado regularmente por una cápsula fibrosa, de forma regular y células bien diferenciadas (similares a la célula que le dio origen). Una neoplasia benigna sólo causa daño por compresión a los órganos o tejidos vecinos y no recurre después de la extirpación quirúrgica. Las neoplasias malignas o cáncer, se caracterizan por tumores donde hay células que se multiplican sin control y tienen capacidad de invasión. Se pueden diseminar hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático, generando lo que se denomina metástasis [127].

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre son los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado y en la mujer son los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.

A nivel molecular, el cáncer es una enfermedad que se genera a partir de la acumulación de aberraciones genéticas que causan la desregulación de múltiples vías celulares. Durante los últimos años se han realizado análisis genéticos de diferentes tumores que han permitido la caracterización de distintas vías moleculares alteradas durante el

desarrollo y la progresión de esta enfermedad. Se han identificado conjuntos de genes cuya expresión en tumores primarios se asocia con mayor riesgo de metástasis y pobre pronóstico de la enfermedad. La consecuencia de la desregulación de diversas vías de señalización en cáncer genera la desdiferenciación celular, la evasión de la apoptosis, el incremento de la proliferación, migración e invasión celular, entre otros eventos. Todo esto favorece la formación de los tumores y metástasis en estadios avanzados. La sucesión de esos cambios genéticos hacen que las células malignas adquieran alguna ventaja que va provocando la transformación de células normales en células tumorales [127].

Durante el desarrollo del tumor maligno las células tumorales se relacionan constantemente con el microambiente circundante para inducir la proliferación de células tumorales, la transición epitelio-mesenquimal (EMT), la migración, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Es así que estos tumores se asocian con células normales de tejido conectivo y vasos sanguíneos que funcionan como estroma de sostén y le brindan los nutrientes que necesitan para proliferar [127, 128].

En la EMT, la transformación de las células epiteliales diferenciadas va llevando a la pérdida de la adhesión célula-célula y su polaridad para desarrollar un fenotipo mesenquimal. Las células epiteliales expresan altos niveles de E-cadherina, mientras que las células mesenquimales expresan altos niveles de N-cadherina, vimentina (Vim) y fibronectina. Luego de la EMT, las células adquieren capacidades migratorias y de invasión, lo cual se considera el inicio del proceso de metástasis [127, 129].

Cuando el tamaño del tumor aumenta las células tumorales centrales se someten a un microambiente hipóxico. Este estímulo induce la expresión de factores de angiogénesis tales como el EGF y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La angiogénesis es el proceso fisiológico por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Muchos cánceres explotan los mecanismos angiogénicos para estimular el crecimiento tumoral y la progresión de la enfermedad. La invasión es el primer paso antes de la metástasis. La metástasis es un proceso de diseminación de células tumorales a partir de una masa tumoral primaria a un sitio diferente a través de vasos sanguíneos y vasos linfáticos [127, 130-133].

#### **9.1.1. Breves nociones sobre el cáncer de mama**

El cáncer de mama se origina a partir de los diferentes elementos que constituyen la anatomía del tejido mamario. Según la American Cancer Society los carcinomas de mama



más comunes son los ductales y los lobulillares, los cuales si no se han propagado se clasifican como “*in situ*” mientras que los que se han esparcido al tejido mamario circundante se los clasifica como “invasivos” o “infiltrantes”.

Los tumores de mama se clasifican en: los que expresan receptor de estrógeno (ER+) y los que no expresan receptor de estrógeno (ER-). Los carcinomas ER+ son de baja agresividad y tienen buena respuesta al tratamiento mientras que los ER- son agresivos y aún no poseen un tratamiento adecuado. Un cáncer de mama puede comenzar como ER+ y convertirse gradualmente en ER- a medida que progresa la EMT [134].

Actualmente existen tres clases principales de terapia endócrina en el cáncer ER+: los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), los reguladores negativos del receptor de estrógeno (SERD) y los inhibidores de aromatasa [135]. El prototipo del SERM es el tamoxifeno, que compite con el  $E_2$  por su unión al ER y en tejido mamario actúa antagonizando las acciones mitogénicas de los estrógenos. Sin embargo tiene funciones parcialmente estrogénicas en ciertos tejidos [136]. El Fulvestrant, que funciona como un SERD, es un antagonista de ER en todos los tejidos y compite por la unión de  $E_2$ , acelerando la degradación del receptor. Un problema importante en el tratamiento del cáncer de mama es que muchas pacientes, particularmente aquellas con enfermedad metastásica, rápidamente desarrollan resistencia a estos tratamientos.

De acuerdo con los perfiles de expresión génica, la clasificación de los tumores de mama es más amplia dado que se tiene en cuenta también la expresión del receptor de P4 (PR) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2). Los subtipos del cáncer de mama según la expresión de receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER), PR y HER-2 se indican en la Tabla 1 [137].

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es el subtipo de cáncer de mama que posee el comportamiento más agresivo. Tal como se detalla en la Tabla 1, se define por la ausencia de expresión de ER, de PR y de HER-2. La incidencia del TNBC es de aproximadamente el 15% del cáncer de mama y, por lo tanto, es un área importante de investigación. Los TNBC presentan mal pronóstico, son insensibles tanto a la terapia endócrina como a la inmunoterapia (Trastuzumab y Lapatinib) por lo que no existe un tratamiento adecuado para este tipo de patología [138]. Los TNBC están asociados con riesgo incrementado de metástasis y alto grado de recurrencia. Los pacientes con TNBC tienen peor pronóstico y sobrevida más corta entre todos los tipos de cáncer de mama [134, 139]. Hoy en día el tratamiento se basa en cirugía y quimioterapias que presentan poco éxito.

**Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama en base a la expresión de ER, PR y HER-2.** Al menos uno de los receptores ER y/o PR debe estar expresado en los tumores de tipo luminal.

Nombre	ER	PR	HER-2
Luminal A	+/-	+/-	-
Luminal B	+/-	+/-	+
HER-2 sobreexpresado	-	-	+
Triple negativo	-	-	-

### 9.1.2. Generalidades sobre modelos de cáncer de mama *in vitro*

Las líneas celulares de cáncer de mama humanas que se utilizan para el estudio de esta enfermedad a nivel mundial se obtuvieron a partir de muestras de pacientes y continúan siendo expandidas en el laboratorio. La mayoría de los modelos actuales fueron obtenidos de muestras de pacientes en la década del 70. En este trabajo fueron utilizadas las líneas que con más frecuencia aparecen en los trabajos de investigación. Ellas son: MDA-MB-231 [140-142], Hs578T [142, 143], MCF-7 [142, 144] y T47D [142, 145]. Las líneas celulares de cáncer de mama pueden exhibir fenotipos epiteliales o fibroblásticos como se refleja por sus morfologías y expresión de proteínas [146]. Una célula de cáncer de mama con un fenotipo epitelial puede experimentar una transición a un fenotipo fibroblástico, lo que da lugar a una capacidad más invasiva. La progresión del cáncer de mama en humanos resulta primero en la pérdida de ER y, posteriormente, en la adquisición de Vim. Esto último se asocia con un mayor potencial metastásico a través de una mayor capacidad de invasión [146]. La falta de ER y la presencia de Vim se asocian con un mal pronóstico en el cáncer de mama humano. Las líneas celulares MCF-7 y T47D son ER+/VIM-, no son invasivas y tienen un fenotipo tendiente al epitelial. Las líneas MDA-MB-231 y Hs578T son ER-/VIM+ y presentan un fenotipo altamente invasivo con tendencia a un fenotipo fibroblástico [147-149].

Recientemente se realizó una caracterización molecular por inmunocitoquímica utilizando marcadores que permitieron verificar las características fenotípicas de varias líneas de cáncer de mama [150]. Se ha agregado a Ki 67 que es un marcador de proliferación estudiado en los últimos tiempos. En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características fenotípicas de las líneas utilizadas en este trabajo de tesis [149-151].

**Tabla 2. Características fenotípicas y de las líneas celulares de cáncer de mama Hs578T, MDA-MB-231, T47D y MCF-7.**

Nombre	Clasificación	ER	PR	Her 2	Ki 67	ACSL4	Vim	Agresividad	Migración
Hs-578-T	TNBC	-	-	-	++++	++++	+++	++++	++++
MDA-MB-231	TNBC	-	-	-	++++	++++	+++	++++	++++
T47D	Luminal A	++	++	-	++++	+	-	++	++
MCF-7	Luminal A	+++	+	-	++++	-/+	-	+	+

## 9.2. Rol del metabolismo del ácido araquidónico en la tumorigénesis

Se ha demostrado que la alteración del metabolismo del AA contribuye a la tumorigénesis y la progresión tumoral [152-155]. La metabolización del AA, juega un rol importante en la carcinogénesis en colon, hígado, mama y próstata, [148, 156-160].

Estudios epidemiológicos, clínicos y en animales proporcionaron evidencia de que la activación de las vías de la Ciclooxygenasa (COX) y Lipooxygenasa (LOX) durante la inflamación crónica y la carcinogénesis da como resultado un metabolismo aberrante del AA, que puede contribuir a la carcinogénesis [9]. Se ha informado que los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) tienen efectos beneficiosos en la reducción del riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, incluidos cáncer de mama, colon, pulmón y próstata [161]. Los AINEs ejercen sus efectos antiinflamatorios y antitumorales al reducir la producción de prostaglandinas (PGs) a través de la inhibición de COX. Un incremento de la actividad de las LOX estimula la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis de células cancerosas [162-166]. Las LOX se sobreexpresan en diversos tipos de cáncer: gástrico, de mama y de tiroides anaplásico [167-169]. La sobreexpresión de LOX potencia la proliferación celular y la angiogénesis tumoral en distinto tipos de tumores [166, 170].

La sobreexpresión de COX-2 ha sido detectada en tumores de mama, colorectal, páncreas y pulmón entre otros [171-174], correlacionándose con un mal pronóstico. La inducción o sobreexpresión de COX-2 está asociada con un aumento de la producción de PGE<sub>2</sub>, uno de los principales productos de COX-2.

Los eicosanoides proinflamatorios son producidos en forma abundante por varios tipos de células cancerosas y células circundantes al tumor. La inflamación es reconocida como un componente crítico de la iniciación y la progresión tumoral. El microambiente tumoral está infiltrado con células inflamatorias que producen una variedad de mediadores citotóxicos entre los que se encuentran los eicosanoides que contribuyen a la inflamación, proliferación,

supervivencia y migración celular. Las PGs y los LTs pueden actuar sobre estos mecanismos a través de múltiples vías de señalización tanto de forma autocrina como paracrina. En general, el microambiente inflamatorio, que está asociado con cambios en los perfiles de leucocitos, así como su funcionalidad, puede iniciar la transformación de células epiteliales y promover el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Las PGs y los LTs son inmunomoduladores clave que median la interrelación de señales entre las células epiteliales y las células estromales circundantes en el microambiente del tumor [175].

La PGE<sub>2</sub> proinflamatoria es la más abundante en diversos tipos de cáncer humano, incluyendo cáncer de colon y recto, pulmón, mama y cáncer de cabeza y cuello, y a menudo se asocia con un mal pronóstico [176]. Se sabe que PGE<sub>2</sub> tiene un papel predominante en la promoción del crecimiento tumoral, modula la proliferación, la muerte celular y la invasión tumoral en muchos tipos de cáncer.

### 9.3. Expresión y función de ACSL4 en cáncer

Se ha demostrado en numerosos estudios que en varios tipos de cáncer como el de colon, hígado, mama y próstata [148, 149, 151, 156, 157, 159, 177-180] existe un incremento en la expresión de ACSL4 lo cual se ha asociado con una mayor agresividad tumoral.

Particularmente, en nuestro laboratorio describimos el rol de ACSL4 en el aumento de la agresividad tumoral en cáncer de mama [148, 149, 151]. Los niveles de esta enzima están elevados en líneas celulares de cáncer de mama TNBC altamente agresivas como MDA-MB-231 y Hs578T, en comparación con las líneas T47D y MCF-7 que presentan menor agresividad y expresan receptores de estrógenos. Otros trabajos demostraron también que la sobreexpresión de ACSL4 correlaciona inversamente con la expresión de ER en líneas celulares de cáncer de mama [151, 178, 179]. Esta correlación inversa también fue observada por otros autores en muestras de tumores de pacientes [178] observándose la mayor expresión de ACSL4 en TNBC. Cuando se realizó la sobreexpresión transitoria de ACSL4 en células MCF-7, las células desarrollaron mayor agresividad observándose un aumento de la invasión, migración y proliferación celular. Al inhibir la expresión de ACSL4 mediante la utilización de un siARN en células MDA-MB-231 se observó una disminución en la agresividad de la línea [151, 179].

Para continuar los estudios sobre el rol de ACSL4 en cáncer de mama se utilizó un modelo experimental diseñado en el laboratorio. Se obtuvieron líneas estables de células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 bajo un promotor reprimible por tetraciclina o doxyciclina

(MCF-7 Tet-Off/ACSL4). Estas células muestran una tasa de proliferación y migración incrementada respecto de la línea celular control MCF-7 Tet-Off. El tratamiento con tetraciclina inhibe específicamente la expresión de ACSL4, revirtiendo el fenotipo agresivo. Utilizando células de la línea MCF-7 Tet-Off/ACSL4 se realizaron experimentos *in vivo* en un modelo xenogénico (ratones nude atímicos hembra) logrando el desarrollo de tumores, cuyo crecimiento fue inhibido al disminuir la expresión de ACSL4 con doxiciclina [149]. Cabe destacar que las células de la línea MCF-7 no desarrollan tumores cuando son inoculadas en los ratones mencionados previamente, sin embargo, al sobreexpresar ACSL4 pueden producir tumores aún sin el agregado de estrógenos [179].

A través de experimentos de *RNA secuencing* (RNAseq) y proteómica funcional, en nuestro laboratorio se identificaron las vías de transducción de señales reguladas por ACSL4 en el desarrollo del fenotipo agresivo. La secuenciación de más de 30.000 transcriptos mostró que las células que sobreexpresan ACSL4 poseen alrededor de 4.000 transcriptos que presentan diferencias significativas de expresión con respecto a las células controles. De los mismos alrededor de 2.500 están incrementados y 1.500 están disminuidos. El análisis bioinformático mediante el programa IPA (análisis proteómico funcional) demostró que diferentes funciones celulares se ven afectadas por ACSL4 como por ejemplo las relacionadas con la proliferación, migración e invasión. Se identificó la vía de señalización AKT-mTOR-p70S6K como una de las principales vías involucradas con el mecanismo de acción de ACSL4 en el comportamiento tumoral [148].

Los estudios de proteómica funcional fueron realizados a través de la técnica *Reverse phase protein array* (RPPA), que consiste en la detección de proteínas de diferentes vías de señalización y su estado de fosforilación por anticuerpos específicos. El patrón de expresión de proteínas y/o fosforilación fue notablemente diferente entre las MCF-7 Tet-Off/ACSL4 y MCF-7 Tet-Off. El análisis de los resultados a través del programa *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID), permitió determinar que ACSL4 regula la vía de mTOR a través de la fosforilación de proteínas asociadas a esta vía [148].

Se determinó que la sobreexpresión de ACSL4 desencadena la fosforilación de proteínas que actúan río abajo del complejo mTORC1 como la proteína ribosómica S6 quinasa 70 kDa polipéptido 1 (p70S6K) y su sustrato, la proteína ribosómica S6. También aumenta la fosforilación del factor de iniciación 4E-BP1, sustrato de mTORC1. En cuanto al complejo mTORC2, se observó que la sobreexpresión de ACSL4 desencadena la fosforilación del componente Rictor. Otra fosfoproteína que es modulada por la expresión de ACSL4 es la proteína quinasa activada por AMP subunidad catalítica alfa 1 (AMPK). ACSL4 disminuye los niveles de fosforilación de AMPK [148]. Esta proteína cuando se fosforila, regula

negativamente el complejo mTORC1 fosforilando al componente Raptor. La sobreexpresión de ACSL4 produce un aumento en la fosforilación de AKT y de las Glucógeno sintasa quinasa-3 alfa y beta (GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ ). La fosforilación inhibe la actividad de GSK3 (regulador negativo de la vía) contribuyendo a la activación de mTOR. La sobreexpresión de ACSL4 incrementa los niveles de factores de crecimiento y sus receptores, entre los cuales se encuentra IGFBP2, un regulador río arriba de mTOR. La sobreexpresión de ACSL4 también disminuye los niveles de IRS1, cuyo reclutamiento en la vía de la insulina puede activar mTORC1 a través de la activación de AKT. A su vez, la activación de p70S6K por mTORC1 promueve la fosforilación de IRS1 y reduce su estabilidad, una vía de regulación que tiene profundas implicancias en las enfermedades metabólicas y tumorigénesis. Todas estas fosforilaciones dan como resultado la activación de la vía de mTOR. La activación de la vía mTOR también fue confirmada en otros modelos tales como células T47D que sobreexpresan ACSL4 y células MDA-MB-231 donde se ha inhibido la expresión de ACSL4 [148].

El análisis de RPPA mostro que la expresión de ACSL4 disminuye los niveles de ER [148]. Esta regulación también fue demostrada anteriormente por otros autores [178, 179]. La combinación de inhibidores de ACSL4 (Rosiglitazona) y de ER (Tamoxifeno) mostró un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular *in vitro* y del crecimiento tumoral *in vivo*. Además la combinación inhibió la proliferación celular y el crecimiento tumoral en células MDA-MB-231 [148]. Estos resultados sugieren que, la inhibición conjunta de la vía de ACSL4 y ER podría ser una estrategia interesante en el tratamiento del cáncer de mama dado que estas drogas podrían ser utilizadas en dosis menores a las de los tratamientos convencionales, disminuyendo los efectos colaterales.

Recientemente se demostró el rol funcional de ACSL4 en cáncer de próstata. Se ha reportado en líneas celulares y muestras de tumores de pacientes que los niveles incrementados de ACSL4 se relacionan con disminución de la expresión del receptor de andrógenos (AR) o con la insensibilidad a los andrógenos en cáncer de próstata [157], por lo cual se ha postulado que la expresión de ACSL4 es indicativa de insensibilidad a los andrógenos más allá de la simple ausencia de AR en este tipo de cáncer. Esto posiciona a ACSL4 como un buen biomarcador de los cánceres de próstata resistentes a la castración [157].

Por lo tanto, la inhibición de ACSL4 tiene un beneficio potencial en aplicaciones terapéuticas en el futuro y también es importante el rol que pudiera tener como biomarcador en la agresividad del cáncer de mama debido a su correlación al cáncer TNBC.

## 10. Rol de ACSL4 en el Sistema Nervioso

### 10.1. Generalidades sobre la neuroglía

El SN está compuesto de neuronas y células gliales que funcionan en conjunto. La glía supera en una relación 10:1 a las neuronas aunque se ha observado una proporción cercana a 1:1 en regiones específicas del cerebro [181]. Las células gliales se clasifican, según su morfología, función y localización [182] en:

- microglía, las únicas células gliales de origen inmunitario que llegan al cerebro a través de la sangre durante el desarrollo temprano;
- astrocitos, que son los responsables de la regulación del flujo sanguíneo del sistema nervioso central (SNC), del fluido intersticial sináptico y están involucrados en el metabolismo del SNC y en la formación de cicatrices gliales, entre otras funciones. Poseen una participación en la sinaptogénesis y en la transmisión sináptica siendo miembros de la “sinapsis tripartita”;
- células de Schwann y oligodendrocitos, que forman capas de mielina alrededor de los axones en el sistema nervioso periférico (SNP) y SNC respectivamente.

La figura 8 muestra un esquema de la relación entre microglía, astrocitos, oligodendrocitos, sinapsis y vasos sanguíneos en el SNC [183].

#### 10.1.1. Funciones de los astrocitos en la glía

Los astrocitos y las neuronas derivan del mismo precursor neuroepitelial. Los astrocitos son el tipo de célula glial más numerosa en el SNC constituyendo el 25% del volumen cerebral [184]. Presentan una morfología globosa con varias ramas principales que dan lugar a procesos muy ramificados con distribución uniforme. Se identifican en experimentos inmunohistológicos utilizando anticuerpos contra proteína ácida fibrilar glial (GFAP) [182]. Los procesos finos de los astrocitos rodean o entran en contacto con neuronas mediante pies neuronales en las sinapsis o forman pies vasculares o “podocitos” que entran en contacto con la vasculatura del cerebro [185]. A esta íntima unión entre neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos se le denomina unión neurovascular [182]. Se ha estimado que cada astrocito se asocia con alrededor de cuatro neuronas,  $10^5$  sinapsis y uno o dos capilares [186]. También algunos procesos de astrocitos vecinos contactan entre sí. Las propiedades estructurales del citoesqueleto de los astrocitos son mantenidas gracias a la red de filamentos

intermedios de la cual el componente fundamental es GFAP [182]. Existen astrocitos especializados como la glía de Müller en la retina, o la glía de Bergmann en el cerebelo [187]. Las células de estirpe astrocitaria de la zona subventricular (SZV) constituyen un subtipo de astrocitos con capacidad proliferativa en cerebro adulto [182].

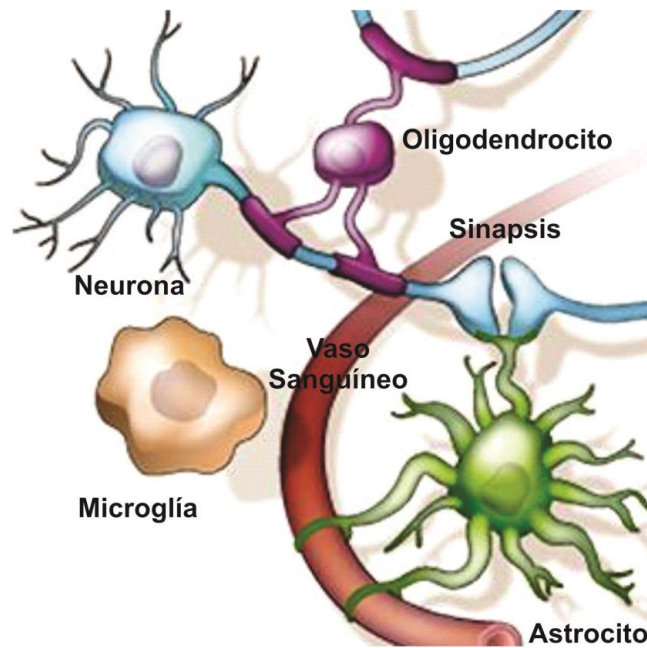
Los astrocitos son elementos esenciales de los circuitos neuronales y son responsables de la regulación del flujo sanguíneo local como parte de la unidad neurovascular [185]. La actividad neuronal, reflejada en la liberación de neurotransmisores desde las neuronas, activa receptores de los astrocitos [185] lo que desencadena una respuesta que promovería la liberación de sustancias vasoactivas en los podocitos [188, 189].

Hay evidencias de que las señales neuronales inducen en los astrocitos la liberación de mediadores como  $\text{PGE}_2$ , óxido nítrico o AA, que tienen efectos vasodilatadores o vasoconstrictores [190-192]. A través de los contactos de la unidad neurovascular los astrocitos ajustan el flujo sanguíneo a la actividad sináptica, como lo demuestran estudios de corteza visual, donde se han detectado cambios en la microcirculación mediada por astrocitos como respuesta a estímulos visuales [193, 194]. La homeostasis de la unión neurovascular es fundamental para la función cognitiva y su alteración podría estar relacionada con enfermedades como el Alzheimer [195].

Los astrocitos contribuyen al correcto metabolismo del SNC. A través de los procesos que están en contacto con los vasos sanguíneos, los astrocitos captan glucosa de la circulación y proporcionan a las neuronas metabolitos energéticos [187]. Aunque no generan potenciales de acción, los astrocitos son células excitables con propiedades de comunicación: se activan por señales internas o externas y envían mensajes específicos a las células vecinas en lo que se conoce como proceso de “gliotransmisión” [196]. Los astrocitos presentan aumentos transitorios de la concentración de calcio intracelular. Estas oleadas de calcio son las responsables de la comunicación astrocito-astrocito y astrocito-neurona [182].

Los astrocitos participan en la correcta actividad sináptica mediante el mantenimiento de la homeostasis del fluido intersticial sináptico. Envuelven la sinapsis y mantienen los niveles adecuados de pH, iones, neurotransmisores y fluidos [197]. Son importantes en el desarrollo, refinamiento y la modulación de las sinapsis. También contribuyen a la cognición, aprendizaje y memoria. Los axones neuronales en crecimiento son guiados hacia sus blancos mediante moléculas derivadas de astrocitos, como tenascina C y proteoglicanos [198]. Esta participación activa en la sinaptogénesis, no se da únicamente durante el desarrollo sino también tras lesiones del SNC [182].





**Figura 8. Esquema de las interacciones de la neuroglía en el SNC.** Adaptado desde “Neuroscience: Glia-More than just Brain Glue” Nicola J. Allen y Ben A. Barres. *Nature*, Vol 457, Feb 2009 [183].

Existen evidencias de que los astrocitos participan directamente en la transmisión sináptica a través de la liberación de gliotransmisores [199]. Fellin y colaboradores proporcionaron la primera evidencia de que los astrocitos inducen sincronía neuronal mediada por glutamato [200] y Shigetomi y colaboradores demostraron que la excitabilidad de los astrocitos por calcio tiene efectos sobre receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) [201]. Otras sustancias secretadas por astrocitos que pueden estar implicadas en la función sináptica son los ácidos grasos poliinsaturados, hormonas esteroides, D-Serina, factores de crecimiento y citoquinas entre otros [182]. Todas estas evidencias han dado lugar a la hipótesis de la “sinapsis tripartita”, según la cual los astrocitos tienen un papel directo e interactivo en la actividad sináptica y son indispensables para el correcto procesamiento de la información en los circuitos cerebrales [186, 202, 203]. También participan en el refinamiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo y en animales adultos [204].

Una de las funciones más recientemente descritas de los astrocitos es la capacidad neurogénica en el cerebro adulto. Células madre neurales están presentes en los mamíferos no solo durante el desarrollo, sino también en el cerebro adulto, en la pared de los ventrículos laterales de la SVZ. Estas células generan nuevas neuronas [205, 206] que migran a través

de la corriente migratoria rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (BO), donde se diferencian a interneuronas granulares y periglomerulares [207, 208]. Las células madre de la SVZ expresan GFAP y tienen morfología y ultraestructura de astrocitos [209-212]. Los precursores neurales migran hasta el BO rodeados por procesos astrocitarios, utilizando como andamiaje la red de vasos sanguíneos que delimita la RMS. Recientemente se ha demostrado que los astrocitos orquestan la formación y la reorganización estructural de este andamiaje vascular mediante la expresión de VEGF [213].

Los astrocitos no solo contribuyen a la función normal del cerebro, sino que también desempeñan funciones clave en enfermedades o lesiones. La respuesta de astrocitos a una lesión o enfermedad se llama astrogliosis reactiva y se define por cambios morfológicos y moleculares [214]. Los cambios que experimentan los astrocitos reactivos varían según el grado de severidad de la lesión, son regulados por moléculas de señalización inter e intracelular y modifican la actividad astrocitaria mediante ganancia o pérdida de funciones, lo que puede afectar a las células circundantes [215]. La astrogliosis reactiva acompaña a muchas situaciones patológicas que afectan al SNC, como trauma cerebral, lesión medular traumática (LMT), daño isquémico, neuroinflamación o neurodegeneración, daño excitotóxico, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, la epilepsia y enfermedades metabólicas entre otras condiciones patológicas del SN [215-225].

En respuesta a una lesión grave, los astrocitos se tornan reactivos y se someten a cambios inducidos por vías de señalización asociadas con el AMPc, STAT3, NF- $\kappa$ B, Rho, Quinasas c-Jun N-terminal (JNK), calcio y otros [215, 226-228]. Esos cambios incluyen hipertrofia celular caracterizada por el aumento de la expresión de GFAP y proliferación, expresión aumentada del filamento intermedio Vim y de la proteína ligadora de calcio S100 $\beta$  y extensión de las prolongaciones [228, 229]. La proteína S100 $\beta$  estimula la proliferación de astrocitos y se expresa preferencialmente en astrocitos en división. Estos astrocitos reactivos se caracterizan por tener una apariencia morfológica estrellada. Comienzan a expresar muchas moléculas de la matriz extracelular que incluyen proteoglicanos, condroitín sulfato, lamininas y fibronectina [230]. También comienzan a liberar mediadores proinflamatorios que atraen macrófagos y microglía e inducen su proliferación. Varias citoquinas inducen la reactividad de los astrocitos en cerebro de roedores [220]. Los astrocitos reactivos podrían generar efectos negativos después de la injuria que incluyen la exacerbación de cascadas inflamatorias, la liberación de niveles neurotóxicos de especies reactivas del oxígeno y glutamato, y el compromiso de la función de la barrera hematoencefálica (BHE), incrementando la formación del edema citotóxico [215]. Otra alteración molecular es la alteración de la expresión de la glutamina sintasa, que no siempre correlaciona con la de GFAP en la astrogliosis, o el receptor de EGF que se expresa en astrocitos reactivos [220].

Juntos, la matriz extracelular y los astrocitos reactivos forman una densa cicatriz glial y más recientemente los pericitos fueron propuestos como contribuidores clave a las cicatrices gliales [231]. La cicatriz glial tiene consecuencias tanto positivas como negativas en la reparación del SN. En cuanto a las consecuencias positivas, la cicatriz glial promueve la reparación al limitar el daño tisular debido a la inflamación [232]. En el aspecto negativo, las moléculas que componen la matriz extracelular de la cicatriz glial son potentes inhibidores de la regeneración axonal [233].

En respuesta a una lesión, una proporción de astrocitos reactivos proliferan, y esto aumenta la cantidad de astrocitos en el sitio de la lesión [220]. Cuando tales astrocitos son aislados y cultivados *in vitro*, algunos son capaces de formar neuroesferas que contienen autorrenovación y multipotencia. Esta "respuesta de células madre" de los astrocitos en el cerebro adulto de mamífero depende de la lesión, ya que es inducido solo por una lesión "invasiva", como una herida de arma blanca o isquemia, pero no por una lesión "no invasiva", como la amiloidosis crónica o muerte neuronal inducida [220].

Entre los diversos factores endógenos que se han implicado en el inicio y mantenimiento de la astrogliosis reactiva, la adenosina trifosfato (ATP) y otros nucleótidos relacionados con la adenosina juegan un papel importante [234, 235]. Se liberan cantidades masivas de ATP en áreas del cerebro hipóxicas o lesionadas. Esto conduce a una elevación notable de las concentraciones locales de ATP después de la noxa [236-238]. Las células astrogliales expresan receptores purinérgicos P2, principalmente los pertenecientes a la clase P2Y. La activación de este receptor da lugar a una liberación temprana de AA y sus metabolitos en los astrocitos reactivos. También se demostró que la astrogliosis inducida por ATP está mediada por la inducción de COX-2 [234]. También se ha demostrado un rol para la PGD<sub>2</sub> en la astrogliosis. Mientras que las PGs derivadas de neuronas parecen estar más involucradas en funciones relacionadas con la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal, los astrocitos reactivos y la microglía son probablemente las principales fuentes de PGs en condiciones patológicas [239, 240].

El tratamiento con AMPc induce cambios fenotípicos dando como resultado astrocitos con una morfología estrellada y altos niveles de expresión GFAP. Los cambios que induce en la morfología celular y la expresión proteica se han considerado una característica de la activación de astrocitos [235, 241-244]. Los análogos cíclicos del AMP activan la vía de señalización de la PKA [241, 245-247] y conducen a una amplia variedad de cambios fisiológicos en los astrocitos, incluyendo una mayor expresión de los receptores del factor de crecimiento y receptores de citoquinas [248, 249].

## 11. Neuroesteroidogénesis

Los estudios que abrieron el camino para el descubrimiento de síntesis de esteroides en el SNC datan de 1981. En estos estudios se demostró que P5 y dehidroepiandrosterona (DHEA) se acumulan en el cerebro de ratas castradas y adrenalectomizadas [250]. La esteroidogénesis que se lleva a cabo en el SNC se denomina neuroesteroidogénesis. Los neuroesteroides se sintetizan *de novo* a partir de colesterol [251]. La fuente de colesterol en el SNC no son las lipoproteínas de sangre periférica porque la BHE impide su entrada [252]. Las lipoproteínas y el colesterol en el SNC son sintetizados por neuronas [253] y por la glía, fundamentalmente por los astrocitos.

Los esteroides presentes en el SN también pueden provenir de órganos esteroidogénicos periféricos (esteroides periféricos), dado que las hormonas esteroides pueden atravesar la BHE. Estos esteroides periféricos luego de su llegada al SN pueden ser metabolizados localmente como sucede, por ejemplo, en la reacción de aromatización de la testosterona en E<sub>2</sub> [254].

La neuroesteroidogénesis está conservada en los vertebrados y fue descripta en mamíferos, aves, anfibios y peces [255-258]. A diferencia de lo que ocurre con los esteroides circulantes que ejercen sus funciones a gran distancia, los neuroesteroides actúan en el SN de manera autocrina y paracrina. Por ejemplo en células de Schwann del nervio ciático, se sintetiza P4 y esta actúa sobre las mismas células estimulando la expresión de proteínas de la mielina [259]. Después de la remoción de gónadas y glándulas adrenales en roedores niveles significativos de P5 y P4 permanecieron en la médula espinal sugiriendo su síntesis y acción local [260, 261].

Se conoce que la síntesis de neuroesteroides involucra pasos similares a los de la esteroidogénesis en tejidos clásicos. La neuroesteroidogénesis requiere del transporte de colesterol desde la membrana externa a la interna de la mitocondria, que se produce por el complejo molecular del cual forman parte TSPO y StAR que fue descripto con anterioridad. En mitocondrias de células neuroesteroidogénicas, el colesterol se convierte en P5 mediante la acción de P450<sub>scc</sub>; a partir del precursor P5 se producen los diferentes neuroesteroides [259].

Si bien la neuroesteroidogénesis todavía no está completamente estudiada, se ha evidenciado que los astrocitos, oligodendrocitos, y neuronas expresan varias de las enzimas necesarias por lo que son capaces de sintetizar distintos esteroides. Zwain y colaboradores mediante estudios *in vitro* en cerebro de rata han postulado que los oligodendrocitos producen P4, androstenediona y P5, siendo el último el neuroesteroide mayoritario en este tipo celular. Las neuronas producen mayoritariamente estrógenos a partir de P5 y también sintetizan

DHEA y andrógenos [262]. Los astrocitos producen mayoritariamente P4 a partir de P5 [263, 264]. Tanto los astrocitos del hipotálamo entero *in vivo* como cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos de ratas post-púberes expresan las enzimas y proteínas necesarias para la síntesis de P4: P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), StAR y proteína transportadora de esteroides-2 (SCP-2) [263, 265]. En astrocitos la conversión de P5 a P4 y de DHEA a androstenediona a través de la enzima 3 $\beta$ -HSD es inhibida cuando el cultivo presenta una alta densidad [266]. Se ha demostrado un papel relevante de los astrocitos y la interacción con oligodendrocitos y neuronas en la síntesis de DHEA y esteroides sexuales activos. Por lo tanto la neuroesteroidogénesis se logra mediante la contribución tripartita de estos tres tipos de células en el cerebro [262].

Los neuroesteroides en el cerebro participan en la regulación de importantes funciones. Las concentraciones de neuroesteroides varían en respuesta a condiciones fisiológicas tales como estrés, desarrollo, ciclo ovárico, embarazo y postparto y sus fluctuaciones han sido asociadas con la modulación de la subunidad  $\alpha$  del receptor  $\gamma$ -amino-butírico tipo A (GABA<sub>A</sub>). Los neuroesteroides se incrementan en ratas y humanos después de un estrés agudo y este efecto puede representar un mecanismo homeostático para restaurar la función del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal alterado [267].

También las hormonas esteroides en el SN están involucradas en diversos procesos tales como el desarrollo y el dimorfismo sexual del cerebro, la diferenciación gonadal, la reproducción y el envejecimiento [268-272]. En el cerebelo de ratas neonatas, P4 y estrógenos promueven la formación y el crecimiento de dendritas y la sinaptogénesis en células de Purkinje [273-276]. Estos efectos podrían contribuir a la formación de circuitos neuronales durante la vida neonatal. P4 también afecta a células de la glía: disminuye la proliferación y la activación de astrocitos y microglía e incrementa la proliferación y diferenciación de células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) [218, 277]. Algunos esteroides tales como DHEA o E<sub>2</sub> regulan la plasticidad neuronal [278]. Además, la neurogénesis en el cerebro adulto está potenciada por esteroides como el sulfato de P5, E<sub>2</sub> y DHEA [279-281].

### 11.1. Expresión y función de StAR en el sistema nervioso

Numerosos grupos han estudiado la presencia de StAR en el SNC. Furukawa y colaboradores describieron, por primera vez, la presencia de StAR en cerebro de rata [282]. King y colaboradores demostraron la presencia de la proteína y su ARNm en células de la glía y en neuronas de regiones discretas del cerebro del ratón [283]. También se describió su

presencia en cerebro humano [283, 284]. Investigaciones posteriores demostraron que su localización en el cerebro se encuentra conservada evolutivamente [285-287]. Al igual que P450scc y  $\beta$ -HSD la expresión de StAR en el cerebro es mucho menor que en los tejidos esteroideogénicos clásicos siendo aproximadamente del 0.1-1% con respecto a la expresión de la glándula suprarrenal [282, 288]. De acuerdo con su papel crítico en la esteroideogénesis, StAR co-localiza con P450scc en el cerebro humano y de ratón en regiones esteroideogénicas como corteza, hipocampo, hipotálamo, cerebelo y las motoneuronas nerviosas del cráneo. Las dos proteínas co-localizan en precursores y células gliales en el cerebro neonatal y adulto [282, 283, 289-292]. No se ha hallado StAR en oligodendrocitos *in vivo*, a pesar de que los oligodendrocitos expresan varias enzimas esteroideogénicas y pueden producir P5 *in vitro* [262, 292].

Incrementos neonatales en los niveles de StAR, P450scc y el ARNm de la aromatasa en células de Purkinje y otras neuronas cerebelosas se reflejan en altos niveles de síntesis *de novo* de P4 y E<sub>2</sub>, que puede regular el desarrollo dendrítico, de la columna vertebral y la sinaptogénesis [274, 293, 294]. Se ha observado la expresión de StAR en células neuroepiteliales que rodean las paredes de los ventrículos laterales durante los primeros días de desarrollo postnatal. El SNC en desarrollo expresa StAR en células mitóticamente activas en la ZSV y en capas germinales [292]. La expresión de StAR también se encontró en el SN de *Zebrafish* [295].

Se ha demostrado que el mecanismo intracelular que regula la expresión StAR en el SNC involucra el aumento de los niveles de AMPc como se observó anteriormente en los tejidos esteroideogénicos clásicos. La estimulación de la ruta de AMPc induce la expresión de StAR y la esteroideogénesis en neuronas [283, 293, 296-299]. Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que en células gliales en cultivo la expresión del ARNm de StAR se encuentra regulada por AMPc. Tanto en cultivo de astrocitos mesencefálicos como en células de glioma C6 se indujo la expresión del mensajero de StAR y la actividad de su promotor por AMPc y por forskolina [283, 297, 300].

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) a través de la liberación local de LH promueve el incremento en los niveles de StAR en células neuronales humanas. Al igual que en tejidos gonadales, el aumento de los niveles de StAR en respuesta a LH también ocurren dentro de los 30 min en las neuronas del hipocampo primario de rata y en células de neuroblastoma humano M17 *in vitro* [295, 301].

El sistema esteroideogénico completo está involucrado en la respuesta fisiopatológica ante una lesión cerebral. La inducción temprana de StAR es seguida por aumentos

posteriores en la expresión de TSPO, aromatasa, ER y AR en neuronas, astrocitos reactivos y células de la microglía [302-304]. Un aumento de la expresión aguda de StAR después de una lesión cerebral puede ser el primer intento de responder a la neurodegeneración primaria, retrasar la muerte celular y comenzar la reparación de los circuitos [305-307]. Se han observado cambios en los niveles de StAR ante diferentes injurias del SN. Estímulos como el ácido kaínico que produce muerte excitotóxica (utilizada en un modelo de epilepsia), o el NMDA, estimulan la expresión rápida y transitoria de StAR en el hipocampo [292, 308]. Un daño en la oliva inferior provocada por 3-acetilpiridina eleva los niveles de StAR, P450scc y los niveles de ARNm de aromatasa en las neuronas cerebelosas [293]. Los cambios en la neuroprotección y la densidad espinal de las neuronas en el hipocampo correlacionan con la producción de estrógeno dependiente de StAR. La caída de la expresión de StAR en estas neuronas reduce la síntesis  $E_2$ , aumenta la muerte celular y reduce la proliferación *in vitro* [309-312].

La expresión de StAR puede estar involucrada en la neurogénesis, un fenómeno que se ha relacionado con la formación de la memoria. Los niveles de StAR y su ARNm aumentan frente al envejecimiento en el hipocampo del cerebro de rata. Esto sugiere un posible rol de la neuroesteroidogénesis en procesos de adaptación al envejecimiento cerebral. La presencia de StAR en áreas neurogénicas apoya la idea de que la producción local de esteroides podría regular la neurogénesis durante el desarrollo y en la vida adulta [283, 292].

## 11.2. Rol de los neuroesteroides en lesiones y patologías del sistema nervioso

En ciertas patologías del SN, existen alteraciones de la neuroesteroidogénesis. Por ejemplo, se han visto alteraciones de las concentraciones cerebrales de P4 y alopregnanolona en modelos animales de ansiedad/depresión y en el trastorno de estrés postraumático, y la alteración de la neuroesteroidogénesis también se ha notificado en pacientes con esquizofrenia. [272, 313-316]. A su vez, frente a ciertas patologías o injurias existe una inducción de la neuroesteroidogénesis que previene efectos adversos sobre el SN. Ha sido reportada la inducción de la síntesis de P5, P4 y 5 $\alpha$  dihidroprogesterona en respuesta a LMT, a lesión cerebral traumática (LCT) y a la injuria isquémica del cerebro [261, 317, 318].

En modelos animales de LMT, LCT, neuropatía periférica, isquemia cerebral, apoplejía, trastorno convulsivo, y de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (MS), la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Nieman Pick tipo C, se han demostrado los efectos neuroprotectores, neurotróficos y antiapoptóticos de los neuroesteroides [218, 259, 319-336].

En la LMT se genera gliosis reactiva, desmielinización y proliferación de células de precursores de oligodendrocitos (OPC). En la LMT, los marcadores moleculares de motoneuronas funcionales se deterioran mostrando una degeneración temprana y cromatólisis [337, 338]. La LMT también causa muerte por apoptosis de oligodendrocitos seguida de demielinización axonal secundaria [339-341]. La remielinización post-injuria deriva del reclutamiento de OPC [339, 342-344]. De Nicola y sus colaboradores han demostrado que el tratamiento con P4 posterior a una LMT estimula la proliferación y diferenciación de OPC en oligodendrocitos mielinizantes favoreciendo la remielinización y previene la degeneración de motoneuronas restaurando sus marcadores moleculares y funcionalidad después de injuria de la médula espinal en roedores [218, 277, 345-347]. A su vez la administración de P4 después de una LMT previene la gliosis reactiva [218] y reduce el volumen y la extensión de la lesión, incrementando el número de oligodendrocitos, la proteína básica de la mielina, el número de axones y la recuperación locomotora [347]. Se han demostrado efectos preventivos de P4 en la nocicepción y dolor neuropático que continúan a una LMT [348, 349].

En un modelo de MS, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el pretratamiento con P4 reduce la infiltración celular, aumenta la proteína básica de mielina y la proteína proteolípida, previene la pérdida axonal y la disfunción neuronal, y mejora el comportamiento motor [225, 350-353]. En este modelo el aumento de la síntesis de neuroesteroides contribuiría a reforzar de manera autócrina y parácrina los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de la P4 administrada exógenamente [351].

La administración de P4 después de una LCT disminuyó significativamente el edema cerebral en ratas [346, 354-358], la astrogliosis reactiva [321, 322], la pérdida neuronal y mejora la funcionalidad neural [355]. Los efectos neuroprotectores de P4 también se han estudiado en humanos. Se ha observado una reducción en la tasa de mortalidad de pacientes frente a la administración de P4 en LCT de rango moderado a grave [359-362].

Se conoce que la aromatasa, enzima responsable de la transformación de la testosterona en  $E_2$ , se expresa bajo condiciones normales en las neuronas del cerebro de los mamíferos, pero no en las células gliales. Sin embargo, se ha descrito que ante una injuria cerebral los astrocitos reactivos inducen la expresión de esta enzima para producir  $E_2$  en áreas que rodean a la lesión cerebral y se sugirió que la inducción de la actividad de la aromatasa glial suministra el  $E_2$  que limitaría una degeneración neuronal [363]. Células de glioma de rata (C6) y astrocitos primarios sometidos a injuria presentaron un aumento en los niveles de ARNm, proteína y actividad de aromatasa [364]. El  $E_2$  ejerce su rol neuroprotector a través de la prevención de la astrogliosis reactiva. El aumento de la síntesis local de  $E_2$  tiene efectos establecidos sobre la apoptosis, la gliosis, la citogénesis, la neurogénesis y la



neuroinflamación. En consecuencia, el  $E_2$  disminuye el daño secundario después de una LCT y puede mejorar la recuperación [365]. Estudios en varios modelos han revelado que el  $E_2$  derivado de astrogliá regula la proliferación celular, el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis y la transmisión sináptica [366-368]. El  $E_2$  disminuye la pérdida de neuronas y astrocitos ante diferentes injurias [295, 369].

Los astrocitos no solamente tienen la capacidad de sintetizar  $E_2$ , sino que también son blanco de la acción de los estrógenos. Expresan tanto los receptores ER como  $ER\beta$  en sus membranas plasmáticas o intracelularmente. Se ha demostrado que en respuesta a un tratamiento con  $E_2$  los astrocitos sintetizan P4. Este evento es mediado por el aumento de AMPc, la activación de PKA y la fosforilación de TSPO y StAR en los astrocitos hipotalámicos [370].

En modelos de LCT el  $E_2$  disminuye la diferenciación glial, la proliferación y el número de astrocitos reactivos ubicados en la proximidad de la herida [371, 372]. Además reduce la astrogliosis inducida por isquemia [373]. Muchos estudios han examinado las acciones antiinflamatorias del estrógeno mediante la reducción de la expresión de marcadores inflamatorios por los astrocitos [374-377]. Por otra parte, el  $E_2$  aumenta la expresión de factores que promueven la supervivencia neuronal [378-380]. En humanos la administración de estrógenos luego de una LCT ha generado una reducción en el edema cerebral, el mejoramiento de la discontinuidad de la BHE y una mejora en la supervivencia neuronal [381, 382]. Todas estas acciones del  $E_2$  en la astrogliá correlacionan con una reducción del daño neuronal.

### **11.3. Expresión y función de ACSL4 en el sistema nervioso y en el desarrollo embrionario**

Meloni y colaboradores demostraron por inmunohistoquímica la expresión de ACSL4 en el cerebro humano adulto especialmente en cerebelo e hipocampo [383], mostrando una distribución similar a la obtenida en cerebro de ratón [16].

En un trabajo reciente se ha descripto que la estimulación con dibutilil AMPc (análogo permeable del segundo mensajero AMPc) incrementa la expresión de ACSL3 y ACSL4 en cultivos primarios de astrocitos corticales murinos [21]. En concordancia se observó que el tratamiento con dibutilil AMPc incrementa la esterificación del AA y disminuye la expresión de las proteínas de unión y transporte de ácidos grasos 5 y 7 lo cual favorece la formación de

Acil-CoAs. También se observó que el dibutiril-AMPc aumenta la captación del AA por los astrocitos del medio sin afectar la captación del ácido palmítico [21].

Un análisis de microarrays sobre 16.594 genes mostró que 6.221 se expresaron diferencialmente en astrocitos tratados con 8Br-AMPc. El 42,1% de ellos fueron regulados positivamente por AMPc. Es interesante la observación de que entre ellos se vio una regulación positiva de ACSL4 la cual aumenta su expresión al doble mediante el tratamiento con 8Br-cAMP [384].

Por otro lado, ciertas funciones de ACSL4 en el sistema nervioso (SN) se estudiaron en el modelo *Drosophila melanogaster*. La enzima homóloga a ACSL3 y ACSL4 que se expresa en este modelo se denomina dAcsl. Se demostró que dAcsl y ACSL4 están altamente conservadas en función dado que ACSL4 puede reemplazar las funciones de dAcsl. Durante el desarrollo, el cerebro de la larva mutante dAcsl disminuye la producción de Dpp, una proteína similar a Bmp. Esto resulta en una disminución de células gliales y neuronas, y alteraciones axonales en la corteza visual. Todos estos efectos son revertidos mediante la expresión de ACSL4 en dicho sistema [385, 386]. También se demostró que ACSL4 participa en la señalización Bmp en el desarrollo de las sinapsis y está involucrada en el transporte axonal de vesículas sinápticas que se requieren para el desarrollo normal del SN [386].

Dentro del SN una reducción de la actividad de ACSL4 puede llevar a un metabolismo alterado de los ácidos grasos en neuronas, causando alteraciones en el crecimiento neuronal, sinaptogénesis y otras funciones importantes para el desarrollo cerebral normal. Por ejemplo, se han reportado mutaciones puntuales en el gen de ACSL4 que se vincularon con el retraso mental no sindrómico asociado al cromosoma X. Los varones afectados demostraron discapacidad intelectual no específica y no progresiva, que van de severa a moderada sin convulsiones, mientras que en mujeres portadoras se mostraron capacidades cognitivas altamente variables, desde discapacidad intelectual moderada hasta inteligencia normal. Otras delecciones en el gen de ACSL4 están asociadas a discapacidad intelectual. Además, se ha demostrado que una disminución de ACSL4 reduce la formación de espinas dendríticas, lo que le sugiere que esta proteína juega un papel clave en la maduración y remodelación de las neuronas [387, 388].

*Objetivos*

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha contribuido al conocimiento sobre la regulación de los niveles de expresión de la proteína ACSL4 en distintos modelos. Se ha observado que ACSL4 es regulada por acción hormonal tanto en la fase aguda como crónica de la esteroidogénesis [15, 84, 86, 102, 109, 119]. También, se ha descrito el rol funcional y la expresión diferencial de ACSL4 en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad [148, 149, 151]. Si bien se han caracterizado distintos aspectos sobre el gen de ACSL4, no se han descrito en detalle los elementos que contribuyen a su regulación. En particular, aún no se han estudiado los mecanismos transcripcionales que actúan sobre la regulación de los niveles de ACSL4 en distintos modelos de cáncer de mama humano. ***En este contexto, planteamos la hipótesis de que existirían mecanismos transcripcionales que estarían involucrados en la expresión diferencial de ACSL4 en diferentes tejidos y tumores. Más aún en diferentes líneas de cáncer de mama humano, la activación de diferentes mecanismos regulatorios podría establecer un perfil de expresión particular para esta enzima.***

Las hormonas esteroides poseen múltiples efectos en la función cerebral durante el desarrollo y la adultez. El cerebro es también un tejido esteroidogénico ya que posee las enzimas requeridas para producir esteroides (neuroesteroides) a partir del precursor común, colesterol. Si bien se han descrito con cierto detalle los mecanismos de regulación de la producción de esteroides en sistemas esteroidogénicos clásicos (esteroides de origen endócrino) no se conocen aún los mecanismos que operan en la regulación de la producción de neuroesteroides. Más aún, en tejidos esteroidogénicos clásicos se ha descrito la relación que existe entre la expresión de ACSL4 y StAR [15, 86], relación que aún no ha sido establecida en el tejido nervioso. Incluso existen patologías del SN en las que está involucrada la actividad de ACSL4. Dado que esta enzima participa en la regulación de StAR en tejidos esteroidogénicos estudiaremos su rol en células neuroesteroidogénicas utilizando como modelo de estudio astrocitos. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, ***se plantea la hipótesis de que existiría en astrocitos una regulación de la expresión de ACSL4 y que esta enzima podría estar involucrada en algunas funciones tales como la neuroesteroidogénesis.***

Por todo lo antes expuesto se propone como objetivo general de este trabajo **caracterizar los mecanismos de regulación de ACSL4 en distintos tejidos y profundizar sobre su funcionalidad e implicancia en procesos patológicos.**

Los objetivos específicos de este trabajo de tesis son:

Objetivo específico N° 1- Caracterizar funcionalmente el promotor humano de ACSL4, determinando las secuencias que median la regulación y actividad basal del promotor de la enzima en diferentes modelos experimentales de células de cáncer de mama.

Objetivo específico N° 2- Estudiar la regulación del promotor humano de ACSL4 caracterizando los factores de transcripción involucrados.

Objetivo específico N° 3: Analizar la regulación de la expresión de ACSL4 en astrocitos y evaluar su rol funcional en este tipo celular, en diferentes procesos tales como, la migración, proliferación y producción de neuroesteroides.

## *Materialles y Métodos*

## 1. Materiales y reactivos utilizados

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): XCT-790, puromicina, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), seroalbúmina bovina (BSA), BSA libre de ácidos grasos, estándares de peso molecular para electroforesis, ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), hidroximetil amino metano (Tris), ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetra-acético (EGTA), leupeptina, pepstatina A, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, Temed<sup>TM</sup>, 8-Br-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC) y Poli-L-lisina. Triacsina C fue obtenida de Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA). Las enzimas de restricción, la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), Go Taq ADN polimerasa, dNTPs, inhibidor de ribonucleasas RNasin®, Pfu ADN polimerasa, fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), ADN ligasa de T4 y diversos reactivos de biología molecular fueron provistos por Promega (Madison, WI, USA). Los cebadores utilizados y la desoxirribonucleasa I (ADNasa I) fueron adquiridos en Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). La agarosa D1-LE se adquirió en Biodynamics (Ciudad de Bs. As., Argentina). El material plástico para cultivo se compró a ORANGE (NY, USA). Penicilina-estreptomicina, solución tripsina-EDTA, Opti-MEM, TRIzol®, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), y Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 fueron provisto por Gibco-LifeTechnologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA). El suero fetal bovino (SFB) fue de PAA laboratories GmbH (Pasching, Austria). Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: los anticuerpos policlonales obtenidos de conejo anti-ACSL4 fueron desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Maloberti, Castilla et al. 2005); el anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$ -tubulina fue comprado a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); el anticuerpo policlonal anti-StAR y el monoclonal anti-GAPDH fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA); el anticuerpo monoclonal anti-subunidad 2 del complejo III fue adquirido a Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa fueron adquiridos a BioRad Laboratories (Hércules, California, USA); el anticuerpo policlonal grado ChIP específico para Estrogen Related Receptor  $\alpha$  fue adquirido de Abcam (Virginia, VA, USA). Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), reactivos (acrilamida, bisacrilamida, Bradford y otros) y equipos de electroforesis (Mini-Protean II y equipos de transferencia) fueron provistos por BioRad Laboratories. El equipo de electroforesis para geles de agarosa Gel XL ultra V-2 es de Labnet International (Edison, NJ, USA). El reactivo de detección de Western blot por quimioluminiscencia (ECL) se adquirió en GE (Buckinghamshire, UK). Todos los reactivos comerciales que se utilizaron son del más alto grado de pureza disponible y de calidad para biología molecular.

## 2. Medios de cultivo y soluciones de uso frecuente

Todos los cultivos de células de mamíferos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. El SFB previamente a su utilización se inactivó por calor a 56°C.

DMEM (1 litro): 13,4 g de Dulbecco's modified eagle medium; 2 g de NaHCO<sub>3</sub>; Hepes 4,8 g.

DMEM completo: 100 ml de SFB; 10 ml de penicilina-estreptomicina; 10 ml de Glutamina; DMEM para un volumen final de 1 litro.

DMEM alta glucosa (1 litro): 13,4 g de Dulbecco's modified eagle medium alta glucosa; 2 g de NaHCO<sub>3</sub>.

DMEM alta glucosa completo: 100 ml de SFB; 10 ml de penicilina-estreptomicina; DMEM alta glucosa para un volumen final de 1 litro.

DMEM F12 (1 litro): 13,4 g de Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12); 1,1 g de NaHCO<sub>3</sub>.

DMEM F12 completo: 100 ml de SFB; 10 ml de penicilina-estreptomicina; DMEM F12 para un volumen final de 1 litro.

Los cultivos de bacterias se incubaron a 37°C.

LB (para 1 litro): 10 g triptona; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl.

LB agar (para 1 litro): 1 litro de LB; 15 g agar.

LB ampicilina (para 1 litro): 1 litro de LB; 50 mg ampicilina.

LB agar ampicilina (para 1 litro): 1 litro de LB Agar; 50 mg ampicilina.

Soluciones amortiguadoras generales:

TBS (para 1 litro): 20 ml Tris-HCl 1 M pH 7,4; 29,22 g NaCl.

TTBS (para 1 litro): 1 litro de TBS; Tween 20 0,5%.



TAE (para 1 lit ro): 4,84 g Tris-HCl; 1,14 ml ácido acético glacial; 0,74 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8,3.

PBS (para 1 lit ro): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4).

### 3. Líneas celulares

#### a. Líneas humanas (*Homo sapiens*) de cáncer de mama de diferente agresividad

La línea celular MDA-MB-231 fue obtenida de efusión pleural de una paciente caucásica de 57 años. Estas células presentan una alta tasa de proliferación. Esta línea celular posee un fenotipo altamente agresivo [142] y se clasifican dentro de las TNBC por ausencia en su fenotipo de los receptores de estrógenos, progesterona y Her 2.

La línea celular MCF-7 fue aislada originalmente de un adenocarcinoma mamario de una mujer caucásica de 69 años. Esta línea posee varias características de las células mamarias epiteliales diferenciadas, en las que se encuentra la capacidad de responder a E<sub>2</sub> debido a que expresa ER y posee expresión de PR. Esta línea celular se caracteriza por poseer un fenotipo de características epitelial luminal y poco agresivo [144].

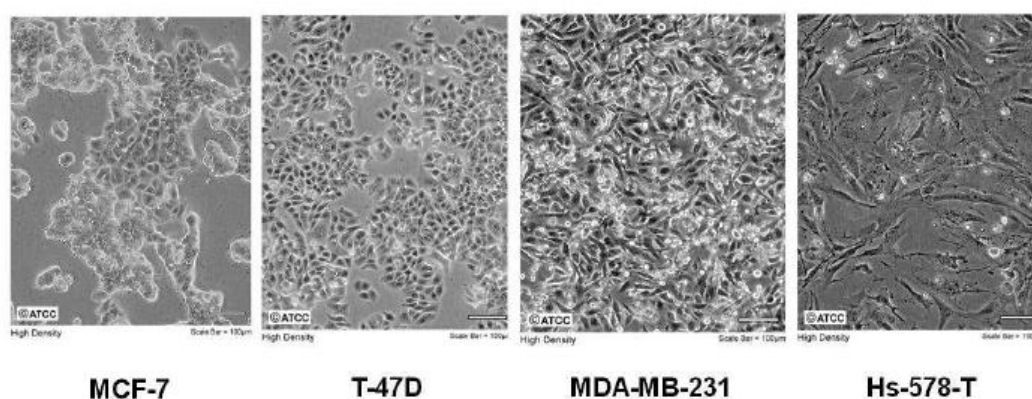
También se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama T47D, como modelo celular de un fenotipo poco agresivo y Hs578T como modelo celular de un fenotipo muy agresivo dentro de las TNBC. La línea T47D tiene morfología epitelial y responde a estrógenos [142, 144]. En cambio, la línea celular Hs578T tiene morfología mesenquimática, expresan Vim como marcador de agresividad y no responden a estrógenos, por pérdida del receptor [140, 142]. En la figura 9 se muestran imágenes de las diferentes líneas celulares descriptas.

Todas estas líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM alta glucosa completo.

### b. Línea de glioma de rata (*Rattus norvegicus*)

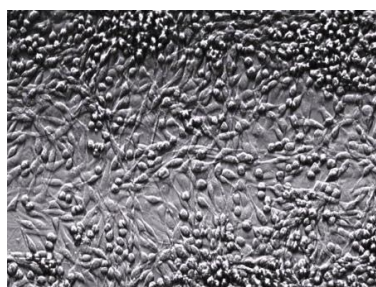
La línea de rata C6 es un modelo de glioma. Fue clonada a partir de un tumor glial de rata inducido por N-nitrosometilurea por Benda y colaboradores después de alternar una serie de pasajes en cultivo y animales [389].

Su morfología es fibroblástica y expresa el receptor de glucocorticoides y el marcador S-100 $\beta$ , el cual incrementa su expresión a medida que alcanzan confluencia. La línea celular C6 es 98% GFAP positiva después de 100 pasajes por lo que se usa ampliamente como una línea celular tipo astrocito para estudiar la función astrocítica [390].



**Figura 9. Líneas celulares de cáncer de mama humano.** Imágenes microscópicas de las líneas de cáncer de mama humano utilizadas en este trabajo de tesis (ATCC).

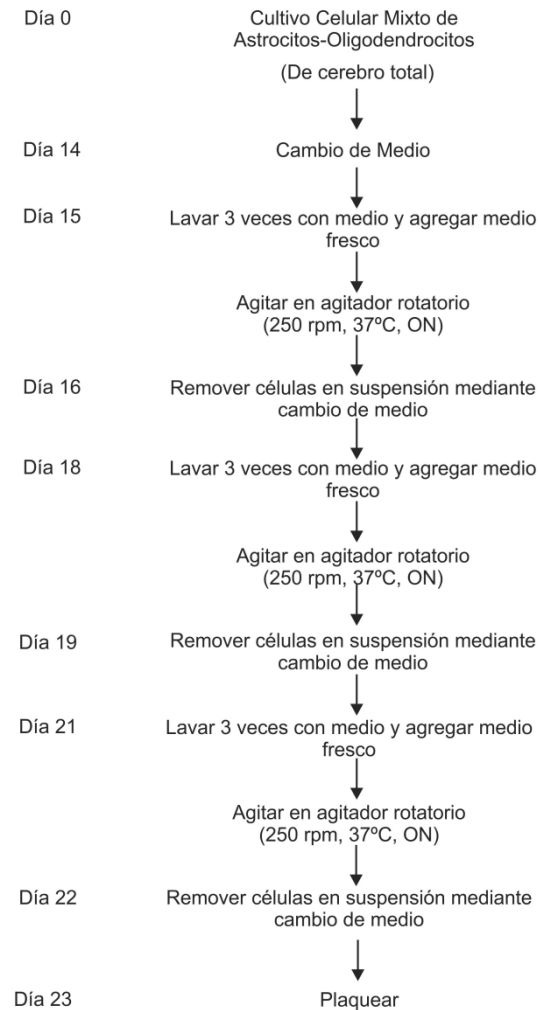
El análisis clonal de células individuales ha revelado que las células C6 también tienen características similares a las células madre de cáncer, incluida la autorrenovación, el potencial para la diferenciación de múltiples linajes *in vitro* y la formación de tumores *in vivo* [391]. La línea C6 se mantuvo en medio DMEM completo. En la figura 10 se muestra una imagen microscópica de la línea C6.



**Figura 10. Imagen de la línea celular C6 de glioma de rata.**

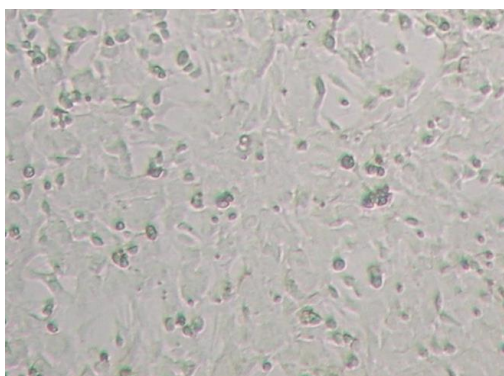
#### 4. Cultivo Primario de Astrocitos de Rata (*Rattus norvegicus*)

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos según el método de McCarthy y de Vellis [392] ligeramente modificado (figura 11).



**Figura 11. Obtención de cultivo primario de astrocitos de cerebro total de rata.** Método de McCarthy y de Vellis [392] levemente modificado. Se indican los días en los que se realizan procedimientos. Durante los días que no están indicados, las células se mantuvieron en reposo incubadas en las condiciones de cultivo indicadas previamente. El medio de cultivo utilizado fue DMEM/F12 completo. ON: durante toda la noche; rpm: revoluciones por minuto.

Brevemente, se utilizaron ratas de la cepa Wistar neonatas de 2 días de edad (P2) que fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro fue disecado. A los hemisferios cerebrales diseccionados frescos, se les separaron las meninges, se lavaron y disgregaron mecánicamente en medio DMEM F12 completo (pH 7,6). El tejido disgregado se sembró en frascos estériles previamente tratados con Poli-L-lisina con el fin de lograr la adherencia de las células a la superficie, utilizando como medio de cultivo DMEM F12 completo. Aproximadamente luego de 14 días de cultivo, la microglía y los oligodendrocitos fueron separados de los astrocitos por agitación orbital (250 rpm) durante 12 horas a 37°C. Para realizar los cultivos, los astrocitos adheridos fueron desprendidos con 0,25% de tripsina luego de un breve lavado con 0,2% de EDTA. Posteriormente, los astrocitos primarios se cultivaron en placas de 6 pocillos o en placas de 21 cm<sup>2</sup> para la realización de los experimentos. En la figura 9 se esquematiza el proceso de obtención del cultivo primario de astrocitos. El cultivo primario de astrocitos se mantuvo en medio DMEM F12 completo. La pureza en cultivo de astrocitos obtenida es del 95%. En la figura 12 se muestra una imagen microscópica de un cultivo primario de astrocitos.



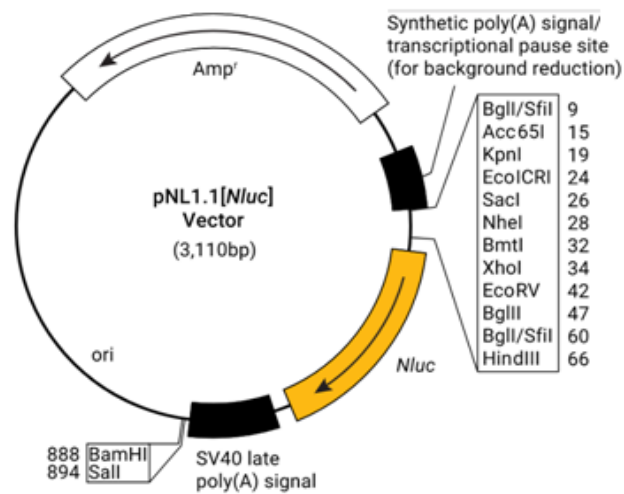
**Figura 12. Imagen del cultivo primario de astrocitos de rata.**

## **5. Plásmidos utilizados**

### **a. Vector reportero pNL1.1**

El plásmido pNL1.1 de Promega (figura 13) fue utilizado como plásmido reportero para secuencias promotoras. El vector contiene el gen reportero NanoLuc Luciferasa (*Nluc*). Este gen produce 150 veces mayor actividad que la luciferasa de *Renilla reniformis*. Se utiliza para evaluar la actividad transcripcional de secuencias de ADN en la cual una

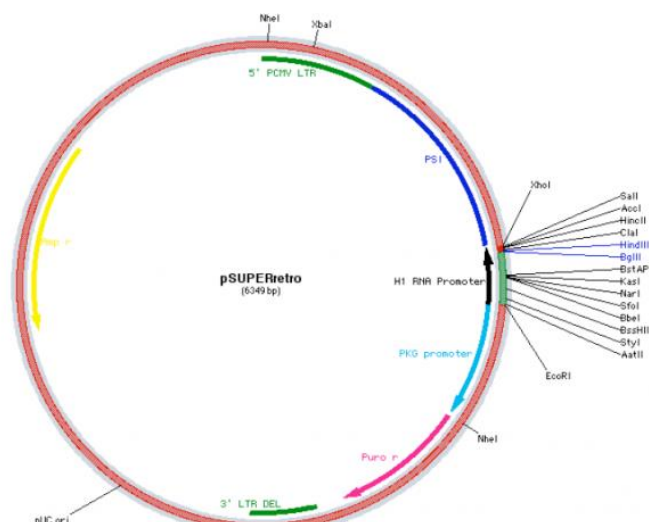
secuencia en estudio es clonada en el sitio múltiple de clonado del vector, río arriba del gen *Nluc* [393]. En este caso utilizamos los sitios de restricción XhoI y HindIII para el subclonado de las diferentes construcciones.



**Figura 13. Mapa del plásmido comercial pNL1.1.**

**b. Vector de expresión de ARN pequeño de interferencia pSUPER.retro.puro**

El plásmido pSUPER.retro.puro de OligoEngine (figura 14), es un vector de expresión de ARN pequeño de interferencia (siARN) de células eucariontes.



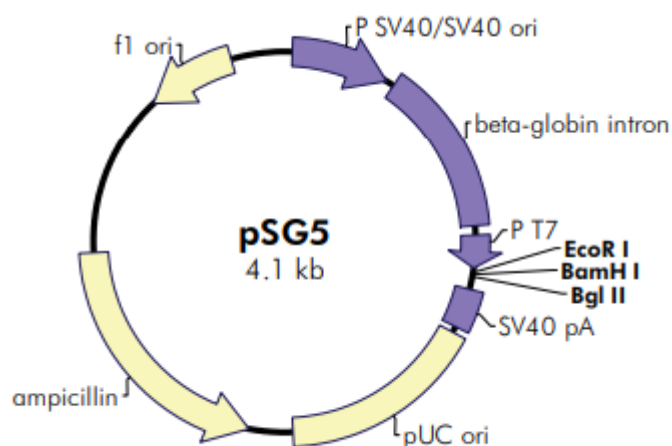
**Figura 14. Mapa del plásmido comercial pSUPER.retro.puro**

Este vector produce un siARN que carece de una cola de poliadenosina, tiene un comienzo de transcripción bien definido y una señal de terminación que consta de cinco timinas sucesivas. Este sistema se ha utilizado para producir una disminución eficiente y específica de la expresión génica. La expresión estable de siARN usando este vector, media en la supresión persistente de la expresión génica, lo que permite el análisis de fenotipos por pérdida de función que se desarrollan durante períodos de tiempo más largos [394].

Este vector se utilizó tanto para transfecciones transcientes como para la producción de líneas que expresen un siARN de forma estable. En este trabajo se utilizó el plásmido pSuper-ACSL4 que ya había sido obtenido en el laboratorio [151] y su correspondiente plásmido vacío. La secuencia del inserto contenido en el pSuper-ACSL4 es 5' AAGATTATTCTGTGGATGA 3'. Si bien anteriormente este plásmido había sido utilizado en células humanas, se verificó que esta secuencia también interfiere el ARN de ACSL4 de rata.

### c. Vector de expresión pSG5

El plásmido pSG5 de Agilent Technologies (figura 15), es un vector de expresión para células eucariontes. Este vector fue utilizado en los estudios de sobreexpresión de genes de forma transciente.



**Figura 15. Mapa del plásmido comercial pSG5.**

En este trabajo se utilizó el plásmido pSG5-ER $\alpha$  ya descrito en la literatura [395] y su correspondiente plásmido vacío.

## **6. Digestión con endonucleasas de restricción**

Para la digestión con endonucleasas de restricción, 1  $\mu$ g de ADN se digirió con 5 UI de enzimas de restricción en una mezcla de digestión que contenía 2  $\mu$ l del buffer de reacción 10X adecuado para la reacción, 2  $\mu$ l de BSA acetilada (2 mg/ml) y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubó durante 2 h a 37°C con agitación suave. Los productos de la digestión se resolvieron en gel de agarosa.

## **7. Electroforesis en geles de agarosa**

Para la resolución de muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa de distintos porcentajes (por lo general entre 1-1,5% p/v) conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y preparados en solución TAE. La separación se realizó en un aparato de electroforesis horizontal conteniendo solución TAE a voltaje constante (80 voltios). La visualización de los fragmentos se realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 305 nm. Se obtuvieron fotografías con una cámara digital Nikon y las imágenes de los geles se cuantificaron con el software Gel-Pro analyzer (IPS, North Reading, MA, USA).

## **8. Purificación de fragmentos de ADN**

Se utilizó este método con el fin de purificar a partir de los medios de reacción los productos de amplificación por PCR y los fragmentos de ADN obtenidos a partir de cortes con enzimas de restricción. Se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para cada purificación de ADN se realizó la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa y se escindió del mismo la banda de interés, la cual fue recolectada en un tubo Eppendorf. Se adicionaron al tubo 10  $\mu$ l de solución de unión a la membrana (isotiocianato de guanidina 4,5 M, AcK 0,5 M, pH 5) por cada 10 mg de gel de agarosa y se incubó 10 minutos a 55-65°C, mezclando vigorosamente cada 2 minutos para disolver la agarosa. Se transfirió la mezcla de gel disuelto a una minicolumna Wizard® conteniendo una membrana de sílica. Luego se incubó por 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 16.000 x g. El ADN quedó adherido a la sílica. Se descartó

el eluido y se lavó la columna con 700 µl de solución de lavado de la membrana (AcK 10 mM; EDTA 16,7 µM; etanol 80% v/v) y se repitió la centrifugación. Se realizó un segundo lavado con 500 µl de solución, centrifugando esta vez durante 5 minutos. Se descartó el eluato y se centrifugó 1 minuto adicional. Se eluyó el ADN con 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas centrifugando 1 minuto a 16.000 x g.

## 9. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación

Los plásmidos fueron cortados con las enzimas de restricción correspondientes y purificados. Los productos de la digestión fueron desfosforilados utilizando CIAP. Esta enzima cataliza la hidrólisis del grupo 5'-fosfato del ADN, ARN y ribo- y desoxirribonucleósidos trifosfatos. La desfosforilación se usa para prevenir la recircularización del vector. El plásmido cortado y purificado fue disuelto en 40 µl de Tris-HCl 10mM pH 8,0. La reacción de desfosforilación contenía el ADN plasmídico (hasta 10 pmol de extremos 5'), 40µl del buffer de reacción CIAP 10X (Tris-HCl 500 mM pH 9,3, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM y espermidina 10 mM) y 5 µl de CIAP (0,01 U/µl) en un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego se adicionó una nueva alícuota de CIAP y se continuó la incubación por otros 30 minutos adicionales a 37°C. Finalizada la incubación se adicionó 300 µl de solución stop (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, SDS 0,5%). La mezcla de reacción se purificó por medio de columna como fue descrito anteriormente. Los fragmentos de ADN purificados y digeridos se ligaron al plásmido correspondiente digerido y desfosforilado. Se colocó 1 µl de solución buffer 10X para ADN ligasa de T4 (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, polietilenglicol 10%, ATP 10 mM), 1 µl (25 ng) del vector, la cantidad correspondiente del fragmento de ADN a ligar en relación molar 3:1 (inserto:vector) y 1 µl de ADN ligasa de T4 (3 UI) en un volumen final de 10 µl. Se dejó transcurrir la reacción durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue como se describe a continuación.

## 10. Cepa bacteriana

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en las transformaciones de plásmidos fue XL1-Blue de Stratagene Labs Systems (La Jolla, CA, USA). Genotipo de la cepa XL1-Blue: endA1, gurA96, hsdR17, recA1, relA1, supE44, thi-1, F'<sup>+</sup>lac<sup>q</sup>Z ΔM15, proAB, Tn10.



**a. Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes**

Para la preparación de bacterias competentes, se inoculó una colonia aislada de la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. A continuación, se sembró una alícuota de 0,1 ml del cultivo de bacterias en 10 ml de medio LB fresco y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial ( $DO_{600nm} = 0,4 - 0,6$ ). Luego, el cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (Sorvall SS34) durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido en 5 ml de  $CaCl_2$  50 mM frío y estéril. La suspensión fue mantenida en hielo durante 20 minutos repitiendo posteriormente el paso de centrifugación. En este caso, el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de solución fría de  $CaCl_2$  50 mM y se incubó durante toda la noche a 4°C con el agregado de glicerol estéril (25%). A continuación, las células fueron fraccionadas en alícuotas de 200  $\mu$ l y se conservaron a -70°C.

**b. Transformación de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes**

Todos los materiales para el procedimiento de transformación, incluyendo las soluciones y los tubos de polipropileno, se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso. El método empleado es una variación del método de Hanahan [396]. Las bacterias competentes se descongelaron durante 30 minutos en un baño de hielo/ $H_2O$ . En un tubo Eppendorf frío se colocaron 10  $\mu$ l de la solución de ADN plasmídico (0,1  $\mu$ g) y se adicionaron 200  $\mu$ l de la suspensión de bacterias competentes mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla. Se dejó estabilizar durante 30 minutos a 4°C y luego se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido inmediatamente por una incubación en hielo durante otros 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 800  $\mu$ l de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60 minutos, para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugó a temperatura ambiente a 10.000 rpm durante 3 minutos y las bacterias del residuo se plaquearon en LB agar ampicilina. La placa se incubó en estufa durante toda la noche a 37°C.

**11. Aislamiento y Purificación de ADN plasmídico****a. Pequeña escala**

Para el aislamiento y purificación del ADN plasmídico en pequeña escala (MINIPREP) se utilizó el sistema Wizard® (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Para la obtención de las bacterias, colonias aisladas seleccionadas con antibiótico se inocularon en 5 ml de LB ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C

con agitación continua. El cultivo obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió en 200 µl de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 µg/ml. A continuación, se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 200 µl de solución de neutralización (AcK 1,32 M pH 4,8). La suspensión obtenida se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se trasvasó a una columna conteniendo la resina DNA Wizard® (Promega) y luego se centrifugó la columna a 10.000 x g durante 2 minutos. El ADN plasmídico quedó retenido en la columna y la misma se lavó con 2 ml de una solución conteniendo NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM y etanol 55 %. Luego se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 2 minutos. Por último, se eluyó el ADN de la resina con 50 µl de agua libre de nucleasas mediante centrifugación a 10.000 x g durante 2 minutos.

#### **b. Mediana escala**

Para la purificación del ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP) se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) procediendo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Colonias bacterianas aisladas transformadas seleccionadas se inocularon en 100 ml de LB ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación continua. El cultivo obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en 3 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 mg/ml. A continuación, se agregaron 3 ml de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 3 ml de solución de neutralización (AcK 1,32 M, pH 4,8). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a un tubo conteniendo la resina DNA Wizard®. La mezcla ADN/resina se trasvasó a una columna conectada a una bomba de vacío. Luego de aplicar vacío, el ADN plasmídico quedó retenido en la columna. La matriz se lavó dos veces con 15 ml de una solución de lavado conteniendo AcK 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM y etanol 55%. Luego de secar la resina durante 30 segundos, se cortó la columna y la parte inferior de la misma se transfirió a un tubo Eppendorf. El sistema se centrifugó a 10.000 x g durante 2 minutos. Finalmente, el ADN de la resina se incubó con 300 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 60°C durante 1 minuto y posteriormente se eluyó por centrifugación a 10.000 x g durante 20 segundos.

## 12. Cebadores utilizados

En la Tabla 3 se indican la totalidad de los cebadores utilizados en este trabajo de tesis indicando en qué tipo de reacción se utilizaron, la denominación del cebador y la secuencia de 5' a 3'.

**Tabla 3. Denominación y secuencia de los cebadores utilizados en este trabajo de tesis.**

Reacción	Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')
Clonado del Promotor	ACSL4 directo	AAA CTC GAG TGG GCT AAG AGA CCG ACA ATA
	ACSL4 reverso	TTT AAG CTT GGC ACT CGG AAA GCT CGC AAA
Deleciones 5'	del -31	AAA CTC GAG GCG TCT TTT CCG GGC TCG
	del -218	AAA CTC GAG GTT AGC CGC CTC GCC TTC
	del -605	AAA CTC GAG ACG TGA AAA TCC TGC GTC CTT
	del -873	AAA CTC GAG GAA TTC TTG AGA TTT ATT TTT TTG G
Deleciones 3'	del +80	TTT AAG CTT CGC TGG GAC GAG GAG GA
	del -14	TTT AAG CTT GAG CCC GGA AAA GAC GC
Mutagénesis sitio dirigida	E2F.a directo	GTC CGG GTG CGC AAG CGC CGC TGC GGC
	E2F.a reverso	GCC GCA GCG GCG CTT GCG CAC CCG GAC
	E2F.b directo	GGC CTC CGC CGC GAA CTC CTC CTC GTC C
	E2F.b reverso	GGA CGA GGA GGA GTT CGC GGC GGA GGC C
	E2F.c directo	GCA CGC GGT TCC TTC TTG CGA GCT TTC CG
	E2F.c reverso	CGG AAA GCT CGC AAG AAG GAA CCG CGT GC
	Sp1 directo	CGG GCG AGC GGG TGC GGG CGC GTG G
	Sp1 reverso	CCA CGC GCC CGC ACC CGC TCG CCC G
	ERRα directo	CTG CTG TTA GGC GCA AGG CTA TCC CGA AAC ACA CTC AAC
	ERRα reverso	GTT GAG TGT GTT TCG GGA TAG CCT TGC GCC TAA CAG CAG
	RORα directo	GAA GTA CTG AAC TTT GTT GGT CAA TCT TGA AAA AG
	RORα reverso	CTT TTT CAA GAT TGA CCA ACA AAG TTC AGT ACT TC
RT-PCR semi-cuantitativa	ACSL4 humano directo	CCC GCT ATC TCC TCA GAC AC
	ACSL4 humano reverso	CAA TTT CAT GGC ATT TGC AG
	L19 humano directo	AGT ATG CTC AGG CTT CAG AA
	L19 humano reverso	TTC CTT GGT CTT AGA CCT GC
ChIP	ERRα ChIP directo	GTG GAG TCC TGC GAA GCA AG
	ERRα ChIP reverso	CGG CTC CGC CTC AAG TTG TTG
qPCR Cuantitativa en tiempo real	StAR Rata qPCR directo	CGG AAC ATG AAA GGA CTG AGG
	StAR Rata qPCR reverso	AGA GTG TTG CTT CCA GTT GAG
	18S Rata directo	ATT CCG ATA ACG AAC GAG ACT
	18S Rata reverso	AGC TTA TGA CCC GCA CTT ACT
	Acsl4 Rata directo	CAC CAT TGC CAT TTT CTG TG
	Acsl4 Rata reverso	GCC TTC AGT TTG CTT TCC AG

### 13. Clonado del promotor humano de ACSL4 de 1,8 kb en el vector pNL1.1

Previamente en el laboratorio, fue obtenido mediante amplificación por PCR de alta fidelidad (Pfu DNA polimerasa) un fragmento de 1,8 kb del promotor humano de ACSL4 conteniendo la mayor parte del exón 1 a partir de DNA genómico humano. Este fragmento se extiende desde el nucleótido -1681 del promotor hasta el +123 del exón 1 y se encontraba clonado dentro del vector pGL3 de Promega entre los sitios de restricción para XhoI y HindIII. Luego este fragmento se clonó en el sitio múltiple de clonado del vector pNL1.1 de Promega (Fig. 11) en el mismo marco de lectura que la secuencia del gen *Nluc*. De esta manera el fragmento de 1,8 kb quedó inmediatamente río arriba del gen *Nluc*. Para ello, se digirió 1 µg del vector pGL3 conteniendo el fragmento del promotor de 1,8 kb y por otro lado 1 µg del vector pNL1.1 con las enzimas HindIII y XhoI. Estas digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1,5%, se aislaron y purificaron mediante columna las bandas correspondientes al pNL1.1 (3,1 kb) y el fragmento del promotor de 1,8 kb. El vector pNL1.1 cortado, aislado y purificado fue desfosforilado y luego se realizó la reacción de ligación entre pNL1.1 y el fragmento del promotor. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes *Escherichia coli* XL1-Blue. Posteriormente se obtuvo el plásmido a mediana escala el cual se denominó pNL1.1-1681.

### 14. Construcción de deleciones unidireccionales progresivas a partir del promotor de 1,8 kb

#### a. Amplificación por PCR de alta fidelidad con la enzima Pfu ADN Polimerasa

Para la construcción de deleciones del promotor humano de ACSL4, se realizó la amplificación por PCR de alta fidelidad de fragmentos del promotor con la enzima Pfu ADN Polimerasa de Promega. Es una polimerasa termófila que replica ADN a 75°C y tiene actividad correctora de errores (proof-reading) debido a su actividad 3'-5' exonucleasa. La tasa de error de esta enzima es un orden de magnitud inferior respecto a la de polimerasas que carecen de actividad proof-reading. Esta enzima no presenta actividad endonucleasa ni actividad 5'-3' exonucleasa. Está recomendado su uso para reacciones de PCR que requieran alta fidelidad de copia. Las reacciones de amplificación del ADN se llevaron a cabo en una solución buffer conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Triton® X-100 0,1%, BSA 0,1 mg/ml, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 200 µM de cada uno de los dNTPs, 50 pmoles de cada cebador, 0,1 µg de ADN templado y 1,25 U de Pfu ADN polimerasa en un volumen final de 50 µl. Se mantuvo la mezcla de reacción en hielo durante la preparación

y la Pfu ADN polimerasa se agregó como reactivo final debido a que un agregado más temprano podría haber degradado los cebadores por su actividad 3'-5' exonucleasa.

Las condiciones generales de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	94°C – 5 minutos	
Desnaturalización	94°C - 30 segundos	} 30 ciclos
Apareamiento	* °C - 30 segundos	
Elongación	72°C – 2 minutos / kb	
Extensión	72°C - 10 minutos	

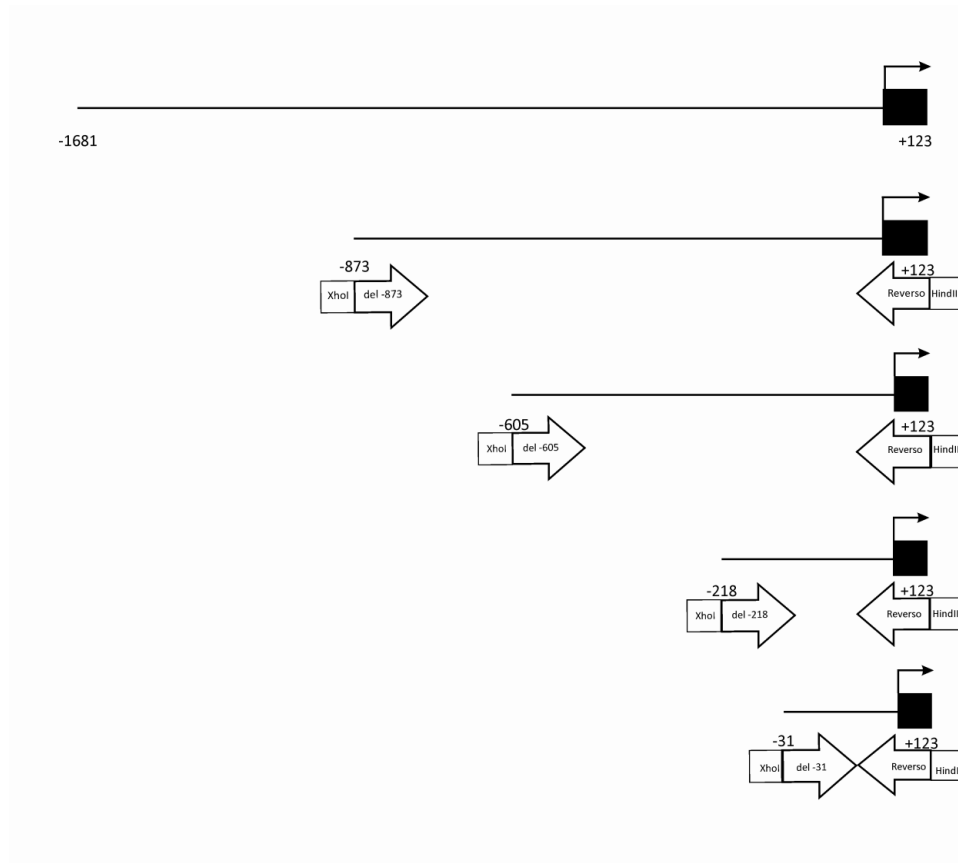
(\*) El T<sub>m</sub> utilizado en cada PCR corresponde al promedio de los T<sub>m</sub> individuales de los cebadores directo y reverso de cada reacción. En el texto que continúa y en las tablas 2 y 3 se indican los T<sub>m</sub> de los cebadores utilizados en todas las reacciones de PCR de alta fidelidad para la construcción de las delecciones del promotor.

#### **b. Construcción de delecciones unidireccionales progresivas 5'**

El promotor de 1,8 kb fue secuencialmente truncado en su extremo 5' mediante PCR de alta fidelidad con la enzima Pfu ADN Polimerasa. Para amplificar los distintos fragmentos del promotor, se utilizó el plásmido pNL1.1-1681 como templado. Como cebador reverso específico en todas las delecciones unidireccionales progresivas 5' se utilizó ACSL4 reverso cuya secuencia se detalló en la Tabla 1. Este cebador es complementario al extremo 3' del promotor de 1,8 kb y tiene un T<sub>m</sub> de 71°C. Contiene en su extremo 3' la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción HindIII. Las cuatro reacciones de PCR de alta fidelidad para la obtención de las delecciones progresivas del extremo 5' se realizaron mediante la utilización de cuatro cebadores directos distintos en cada reacción complementarios al promotor de ACSL4 a partir de las bases: -873, -605, -218 y -31. Los mismos se denominaron: "del -873", "del -605", "del -218" y "del -31" respectivamente (ver tabla 3). Todos estos oligonucléotidos directos se diseñaron con un sitio de restricción para la enzima XhoI en su extremo 5'. En la figura 16 se muestra un esquema de la estrategia para producir las delecciones progresivas 5'. En la tabla 4 se indica el cebador directo, el T<sub>m</sub> de dicho cebador y el tamaño del amplicón obtenido en cada reacción de PCR de alta fidelidad.

### c. Construcción de deleciones unidireccionales progresivas 3´

El promotor de 1,8 kb fue secuencialmente truncado en su extremo 3´ mediante PCR de alta fidelidad con la enzima Pfu ADN polimerasa. Para amplificar los distintos fragmentos del promotor, se utilizó el plásmido pNL1.1-1681 como templado.



**Figura 16. Esquema de la estrategia para producir las deleciones progresivas 5´ a partir del promotor humano de ACSL4 de 1,8 kb.** En cada construcción se señalan las posiciones iniciales y finales de los fragmentos obtenidos. Las líneas negras indican fragmentos de la región promotora. Los cuadrados negros indican el fragmento del exón 1 presente en las construcciones. Las flechas negras indican la posición +1 tomada como referencia en este trabajo. Las flechas blancas indican los cebadores utilizados en cada reacción de PCR de alta fidelidad, indicando la enzima de restricción que corta en su extremo.

Fue utilizado “del -873” como cebador directo específico para todas las deleciones unidireccionales progresivas 3´. Su secuencia se detalló en la Tabla 1. Este cebador que es complementario a la secuencia del promotor humano de ACSL4 entre las bases -873 y -839 tiene un Tm de 67°C. En su extremo 5´ contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI. Las deleciones progresivas del extremo 3´ se realizaron mediante la utilización de cebadores reversos complementarios específicos a partir de las

bases: +80 y -14. Estos cebadores se denominaron: “del +80” y “del -14” respectivamente (ver tabla 3). Están diseñados en su extremo 3' con un sitio de restricción para la enzima HindIII. En la tabla 5 se indica el cebador reverso utilizado para cada construcción, el T<sub>m</sub> de dicho cebador y el tamaño del amplicón obtenido en la reacción de PCR de alta fidelidad.

**Tabla 4. Cebadores directos utilizados en la construcción de las deleciones progresivas 5' del promotor de ACSL4.** Las secuencias de los oligonucleótidos ya fueron detalladas en la Tabla 3. El cebador reverso utilizado en todas las reacciones fue “ACSL4 reverso”.

Fragmento	Cebador directo	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicón (bp)
Delección -31	del -31	73	154
Delección -218	del -218	73	341
Delección -605	del -605	71	728
Delección -873	del -873	67	996

Dentro de las deleciones 3', se obtuvo un último fragmento denominado “Delección +80”. Se utilizó el plásmido pNL1.1-1681 como templado y como cebador directo a “ACSL4 directo” que es complementario al extremo 5' del promotor de 1,8 kb. Tiene un T<sub>m</sub> de 71°C y en el extremo 5' tiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción XhoI. El cebador reverso fue “del +80” con un T<sub>m</sub> de 70°C y la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción HindIII en su extremo 3'. Es complementario a la secuencia del promotor humano de ACSL4 entre las bases +54 y +80. Se obtuvo un de fragmento 1761 bp y se denominó “Delección -1681; +80”.

**Tabla 5. Cebadores reversos utilizados en la construcción de las deleciones progresivas 3' del promotor de ACSL4.** Las secuencias de los oligonucleótidos ya fueron detalladas en la Tabla 3. El cebador directo en todas las reacciones fue “del -873”.

Fragmento	Cebador reverso	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicón (bp)
Delección -873;+80	del +80	70	953
Delección -873;-14	del -14	68	859

#### d. Clonado de deleciones unidireccionales progresivas del promotor humano de ACSL4 en el vector pNL1.1

Los productos de PCR de alta fidelidad se resolvieron en un gel de agarosa 1,5%. Se cortaron las bandas del gel y se purificó el ADN tal como se explica en el apartado correspondiente. Una vez aislado el ADN, los fragmentos se sometieron a una digestión con las enzimas de restricción HindIII y XhoI y se clonaron en los sitios de restricción correspondientes del pNL1.1 aislado y desfosforilado río arriba del gen *Nluc* tal como se explicó anteriormente. Cada uno de los productos de ligación ha sido transformado en bacterias XL1-Blue competentes y se obtuvieron colonias mediante selección con ampicilina. Se obtuvo ADN plasmídico a mediana escala de todas las construcciones a partir del cultivo de una colonia aislada. Las construcciones obtenidas fueron verificadas por mapa de restricción y secuenciación. En la Tabla 6 se indican las denominaciones de los plásmidos obtenidos según el fragmento clonado en el vector.

**Tabla 6. Denominación de los plásmidos obtenidos a partir de las deleciones unidireccionales progresivas del promotor humano de ACSL4 de 1,8 kb.**

Fragmento clonado en el vector pNL1.1	Denominación del plásmido obtenido
Delección -31	pNL1.1 -31
Delección -218	pNL1.1 -218
Delección -605	pNL1.1 -605
Delección -873	pNL1.1 -873
Delección -873;+80	pNL1.1 -873;+80
Delección -873;-14	pNL1.1 -873;-14
Delección +80	pNL1.1 -1681;+80

## 15. Análisis Bioinformática

Para el estudio de los factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de ACSL4, se realizaron diferentes análisis bioinformáticos mediante los programas MatInspector de Genomatix (El Dorado) y Promo 3.0.



## 16. Mutación sitio-dirigida

Con el fin de realizar mutaciones sitio dirigidas de diferentes secuencias consenso de factores de transcripción en el promotor de ACSL4 humano se utilizó el kit de Agilent, QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis [397]. Para generar las construcciones mutantes se realizaron las mutaciones sitio-dirigidas a partir del plásmido pNL1.1-1681 utilizando la enzima Pfu Ultra HF ADN polimerasa de alta fidelidad provista por el kit y un par de cebadores especialmente diseñados para cada mutación (tablas 3 y 7). Los pares de cebadores son complementarios entre sí y contienen las mutaciones diseñadas de las secuencias consenso de los factores de transcripción seleccionados. Los cebadores se diseñaron según las sugerencias del fabricante que indican la ubicación de la mutación en el centro del cebador, un T<sub>m</sub> mayor a 78°C, una longitud de entre 25 y 45 bp, un contenido de CG mayor al 40% y una terminación en C o en G. Se siguieron todas esas sugerencias salvo en la mutación para el sitio consenso de RORα (retinoid-related orphan receptor alpha) en la cual se utilizó el mayor contenido de CG posible. La Tabla 7 contiene las características de los cebadores utilizados para realizar cada mutación.

Luego se realizó la amplificación por PCR de alta fidelidad para cada mutación siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 5 µl del buffer de reacción 10X provisto por el kit, 2 µl (10 ng) del plásmido pNL1.1-1681, 1,25 µl (125 ng) de cada cebador (100 ng/µl), 1 µl de la mezcla de dNTPs provista por el kit y 38,5 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada para llevar a un volumen final de 50 µl. Luego se adicionó 1 µl de Pfu Ultra HF ADN polimerasa (2,5 U/µl) provista por el kit. Las condiciones generales de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	95°C -30 segundos	
Desnaturalización	95°C - 30 segundos	} 18 ciclos
Apareamiento	55°C - 60 segundos	
Elongación	68°C – 1 minutos /1 kb	

Se adicionó luego al producto de reacción 1 µl de la enzima de restricción Dpn I (10 U/µl) que digiere ADN metilado. Se mezcló suave y completamente cada mezcla de reacción pipeteando la solución arriba y abajo varias veces. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora para digerir el plásmido parental (es decir, el no mutado). El producto de la reacción se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue y posteriormente se realizó la obtención de los plásmidos a mediana escala.

**Tabla 7. Características de los cebadores utilizados para realizar las mutaciones sitio dirigidas.**

Se indica también la denominación de las construcciones obtenidas con cada par de cebadores.

Par de cebadores	T <sub>m</sub> (°C)	Longitud (bp)	Contenido de CG (%)	Denominación
E2F.a directo / E2F.a reverso	89	27	81	pNL1.1 -E2F.a
E2F.b directo / E2F.b reverso	83	28	75	pNL1.1 -E2F.b
E2F.c directo / E2F.c reverso	81	29	62	pNL1.1 -E2F.c
Sp1 directo / Sp1 reverso	90	25	88	pNL1.1 -Sp1
ERR $\alpha$ directo / ERR $\alpha$ reverso	81	39	54	pNL1.1 -ERR $\alpha$
ROR $\alpha$ directo / ROR $\alpha$ reverso	68	35	34	pNL1.1 -ROR $\alpha$

## 17. Secuenciación del ADN plasmídico

La secuenciación de todos los plásmidos obtenidos se realizó a través de MacroGen Inc (Seul, Corea).

## 18. Transfección de líneas celulares

### a. Transfección transitoria

Se utilizó el siguiente procedimiento para transfectar transitoriamente células de mamífero en un formato de 24 pocillos. Para transfectar células en otros formatos, el procedimiento se realizó escalando los volúmenes de reactivos utilizados. Un día antes de la transfección, se sembraron 200.000 células en 500  $\mu$ l de medio de cultivo completo para llegar a un 80-95% de confluencia en el momento de la transfección. El medio de cultivo fue reemplazado 24 h después por 500  $\mu$ l de medio completo sin antibióticos por pocillo. Para cada muestra de transfección se prepararon los complejos ADN-Lipofectamina™ 2000 de la siguiente manera: se diluyó 0,8  $\mu$ g de ADN plasmídico en 50  $\mu$ l de medio Opti-MEM sin suero y se mezcló suavemente. En otro tubo se diluyó la cantidad apropiada de Lipofectamina™ 2000 en 50  $\mu$ l del mismo medio (2  $\mu$ l para un pocillo de 24). Se mezcló suavemente e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se combinaron la dilución de Lipofectamina™ 2000 con la del ADN plasmídico y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (volumen final 100  $\mu$ l). Se agregaron los 100  $\mu$ l de complejos ADN-Lipofectamina™ 2000 formados a cada pocillo de células. Se mezcló suavemente. El medio se cambió a las 6 h por medio de cultivo completo. Las células se incubaron durante 48 h salvo que se indique un tiempo diferente en algún experimento en particular. Los controles de los plásmidos se realizaron mediante la transfección del plásmido vacío correspondiente. Para llevar a cabo las transfecciones de las construcciones de las diferentes delecciones, se

tuvo en cuenta el tamaño diferente de los plásmidos a transfectar. Por lo tanto, todos los plásmidos reporteros se utilizaron en cantidades equimolares, y se usó un ADN inerte, pBlueScript, para mantener la masa total de ADN constante [119]. También en un 5% de la masa total de ADN se co-transfectó el plásmido pRc/CMV conteniendo la forma mejorada de la proteína fluorescente verde (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) a modo de vector normalizador. La eficiencia de transfección fue aproximadamente del 40% en MDA-MB-231 y del 70% en MCF-7 como se estimó por conteo de células fluorescentes transfectadas con EGFP. Finalmente, las células fueron procesadas para la determinación de la actividad del promotor como se detalla más adelante.

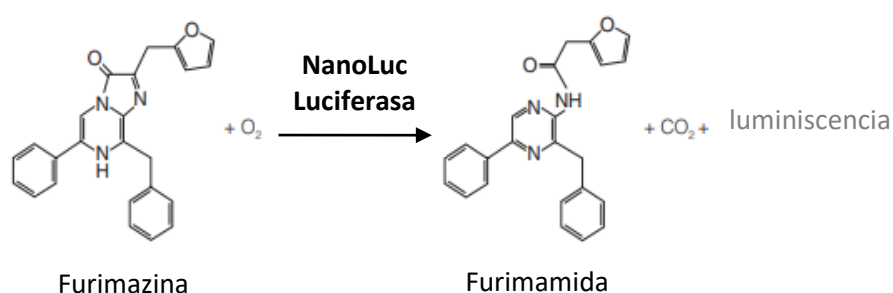
#### **b. Transfección estable**

Se generó la línea estable de células C6 en la cual se disminuye la expresión de ACSL4 mediante un siARN. El procedimiento consistió en transfectar en forma estable, las células de la línea C6 con el plásmido pSuper-ACSL4 que había sido construido anteriormente en el laboratorio. La transfección de las células con la construcción pSuper-ACSL4 lleva a la degradación específica del ARNm. El plásmido contiene un sitio de resistencia a puomicina por lo que este antibiótico fue el que se utilizó para la selección de los clones transfectados. A modo de utilizar un control, se obtuvo también una línea transfectando de forma estable el plásmido pSUPER.retro.puro vacío en células C6.

Brevemente, se cultivaron células C6 en placas de 100 mm de diámetro. Las células fueron transfectadas con el vector pSUPER.retro.puro o el vector pSuper-ACSL4 mediante la utilización de Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 y medio Opti-MEM tal como se explicó en el apartado anterior. Después de 48 horas de realizada la transfección, las células fueron expuestas en forma continua y durante aproximadamente un mes al antibiótico de selección puomicina (3 mg/ml). Las células que sobrevivieron a la exposición al antibiótico fueron aisladas y cultivadas en placas de 96 pocillos (aproximadamente 20 clones). La multiplicación de los clones se realizó mediante sucesivos pasajes a placas de 48, 24 y 12 pocillos y por último a frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Aquellas células cuya transfección se realizó con el vector pSUPER.retro.puro vacío se denominaron "Control". Las que fueron transfectadas con el plásmido pSuper-ACSL4 se denominaron "siARN ACSL4". Para corroborar el nivel de expresión de ACSL4 se realizó el Western Blot correspondiente. En base a los resultados de esta técnica, se eligieron los clones que se utilizaron en los ensayos posteriores.

## 19. Determinación de la actividad de luciferasa

Para la determinación de la actividad de las diferentes construcciones y mutantes del promotor de ACSL4 se utilizó la técnica del gen reportero. Esta técnica permite evaluar la actividad promotora de una secuencia clonándola inmediatamente río arriba de un gen reportero. Un gen reportero es ajeno al organismo con el que se trabaja y expresa una característica detectable. En este caso utilizamos el kit Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega) que utiliza como gen reportero a *Nluc* (gen de NanoLuc Luciferasa) cuyo producto de expresión cataliza una reacción bioluminiscente (figura 17).



**Figura 17. Reacción bioluminiscente catalizada por NanoLuc Luciferasa.**

Brevemente, las células fueron transfectadas e incubadas como se comentó previamente. Después se lavaron con PBS y se lisaron con 50  $\mu$ l de la solución Passive Lysis Buffer 1X (Promega) durante 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. La detección de la actividad de NanoLuc Luciferasa de una alícuota fija de cada lisado de entre 1 y 20  $\mu$ l se realizó mediante la medición de luminiscencia luego de 3 minutos de agregar el sustrato disuelto en el buffer provisto por el kit. La medición se realizó en un lector multiplaca Synergy™ HT (Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Se configuró el lector con una sensibilidad de 100 unidades y un tiempo de integración de 8 segundos. La actividad de NanoLuc Luciferasa se normalizó tanto por el contenido de proteínas totales cuantificadas por el método de Bradford como también por la fluorescencia emitida por la proteína EGFP a 510 nm luego de una excitación a 490 nm y se expresó en unidades relativas. Este método de normalización ha sido utilizado en la bibliografía anteriormente como método alternativo a la *Renilla Luciferasa* [398, 399]. No fue posible en nuestro sistema utilizar el plásmido normalizador *Renilla Luciferasa* dado que era inestable y al realizar el procedimiento de forma manual, fue difícil obtener resultados repetibles de los ensayos con esta forma de normalización. La robustez de la normalización

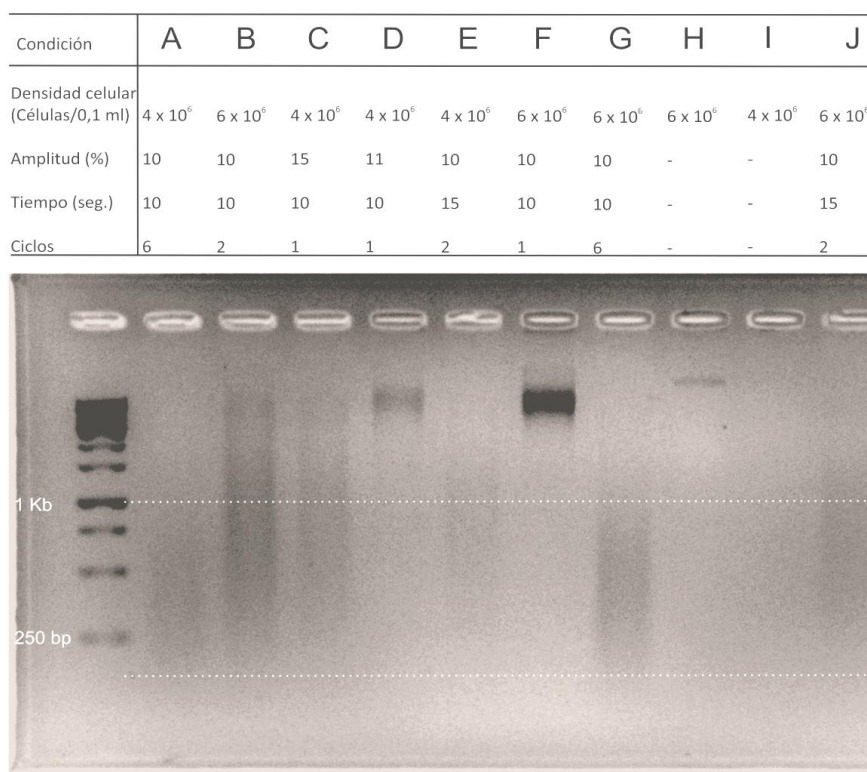
por proteínas totales se comprobó al obtener los mismos resultados mediante la normalización por EGFP. La altísima repetibilidad de los perfiles obtenidos demostró la robustez de los métodos de normalización.

## 20. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayos fueron realizados según el protocolo provisto por el kit EZ-Chip de Millipore [400]. Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina  $4 - 6 \times 10^6$  células se cultivaron en frascos de  $75 \text{ cm}^2$  y se mantuvieron en medio completo durante 24 h. Las células se fijaron y se entrecruzó la cromatina con formaldehído al 1 % final en 10 ml de medio de cultivo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó al medio 1 ml de Glicina 10X (1,25 M) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, para frenar la acción del formaldehído. El medio fue removido con cuidado y se realizaron dos lavados con PBS frío. Luego las células fueron cosechadas mecánicamente en 1 ml de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM, aprotinina 1  $\mu\text{g/ml}$ , y pepstatina A 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células cosechadas se centrifugaron a  $700 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en buffer de lisis SDS (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, EDTA 10 mM, SDS 1%) conteniendo inhibidores de proteasas provistos por el kit.

La cromatina entrecruzada primero fue utilizada para la puesta a punto de la obtención de fragmentos que abarquen un rango de entre 200 y 1.000 pares de bases. La cromatina obtenida se fragmentó mediante la aplicación de ultrasonido (figura 18). Se utilizaron diferentes cantidades de cromatina y se sometieron a pulsos de ultrasonido. Se probaron diferentes cantidades de pulsos, porcentajes de amplitud y tiempos de tal manera de encontrar las condiciones óptimas de fragmentación del ADN genómico. Posteriormente el entrecruzamiento producido por el tratamiento con formaldehído se revirtió mediante la adición de 200 mM de NaCl e incubación a  $65^\circ\text{C}$  durante 5 h. El ARN y proteínas de la muestra fueron removidos mediante la digestión con ARNasa I y Proteinasa K. Finalmente se realizó una corrida electroforética del ADN fragmentado y de esta manera se verificó la mejor condición en la que se obtuvo ADN genómico fragmentado entre 200 y 1.000 pares de bases (figura 18). Tal como se ve en la figura, se optimizaron las condiciones utilizando  $6 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$  como densidad celular y sonicando 6 ciclos de 10 segundos cada uno con un 10% de amplitud (figura 18, carril G). Esta condición es la que se utilizó para realizar los ensayos.

Una vez optimizada la obtención de la muestra de cromatina, se realizó la inmunoprecipitación. Se utilizó una alícuota de 100  $\mu$ l de cromatina entrecruzada y sonicada para cada inmunoprecipitación. A cada alícuota se le adicionaron 900  $\mu$ l de buffer de dilución conteniendo inhibidores de proteasas (SDS 0,01%, Triton® X-100 1,1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8,1, NaCl 167 mM).



**Figura 18. Puesta a punto de la obtención de fragmentos de ADN por ultrasonido para inmunoprecipitación de cromatina.** Ocho muestras de cromatina entrecruzada de células MDA-MB-231 se sonicaron utilizando un equipo Branson con el porcentaje de amplitud, el tiempo y los ciclos indicados. Entre cada ciclo se dejó reposar la muestra en una mezcla de hielo/agua durante 4 minutos. Luego de revertir el entrecruzamiento y digerir ARN y proteínas, las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio. Se utilizaron dos densidades de células distintas para el ensayo. Las muestras de cromatina sin sonicar se corrieron en las calles H e I. En la primera calle se corrió el marcador de peso molecular. A la izquierda de la misma se muestran como referencia los tamaños de algunos fragmentos del marcador. Las líneas punteadas blancas indican las distancias entre las cuales deben correr los fragmentos de ADN para poder realizar la inmunoprecipitación (entre 200-1000 pb).

Luego se incubaron con 60 µl de Proteína G Agarosa 50% en PBS bloqueada con ADN de esperm a de salmón durante 1 h a 4°C en agitación, con el objetivo de pre-clarificar y eliminar la unión inespecífica de proteínas y ADN a la proteína G Agarosa. Después se centrifugó a 3.000 x g por 1 minuto para obtener el pellet de la proteína G agarosa. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se reservaron 10 µl (proporción 1:100 de la muestra) en otro tubo rotulado "INPUT" el cual se conservó a 4°C hasta su utilización. La muestra se inmunoprecipitó agregando 1 µg del anticuerpo específico. Como controles negativos se utilizó 1 µg de anticuerpo IgG normal de ratón provisto por el kit ó ausencia de anticuerpo. Cada tubo se incubó toda la noche a 4°C con agitación. Luego se adicionaron 60 µl de Proteína G Agarosa 50% en PBS a las muestras y se incubó durante 1 h a 4°C con agitación. Después se centrifugó a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el residuo de proteína G agarosa de cada tubo y se lavó y resuspendió sucesivamente con 1 ml de las siguientes soluciones buffer frías incubando 5 minutos. Luego de cada lavado se centrifugó a 3.000 x g por 5 minutos:

1. Un lavado con buffer de baja sal (SDS 0,1%, Triton® X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1, NaCl 150 mM).
2. Un lavado con buffer de alta sal (SDS 0,1%, Triton® X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1, NaCl 500 mM).
3. Un lavado con buffer de LiCl 0,25 M, (IGEPAL-CA630 1%, desoxicolato de sodio 1%, EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 8,1)
4. Dos lavados con buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)

A cada muestra se agregó 100 µl de buffer de elución (5 µl de SDS 20%, 10 µl de NaHCO<sub>3</sub> 1 M y 85 µl de H<sub>2</sub>O). Después se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. A cada tubo, incluyendo el tubo INPUT, se les adicionó 8 µl de NaCl 5M y luego se incubó a 65°C por 5 h con el objetivo de revertir el entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas. Después de este tratamiento las muestras se congelaron a -20°C y el protocolo se continuó al día siguiente. A cada tubo se le adicionó 1 µl de ARNasa A y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego se adicionó a las muestras 4 µl de EDTA 0,5 M, 8 µl de Tris-HCl 1 M y 1 µl de Proteinasa K y se incubó a 45°C por 2 h. El ADN fue purificado mediante columnas provistas por el kit. Finalmente, el ADN recuperado se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real que se detalla más adelante.

## **21. Obtención de lisados totales**

Lisados celulares totales fueron obtenidos después de un lavado de las células con solución salina PBS. La lisis se realizó con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 125 mM y Triton® X-100 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 mM, pepstatina A 1 mM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM, NaF 50 mM y β-glicerol fosfato 40 mM), en una proporción que varió entre 100 y 300 µl/pocillo. Las células fueron cosechadas mecánicamente en frío. Se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos para eliminar residuos. Para los siguientes análisis se utilizó el sobrenadante.

## **22. Obtención de fracción mitocondrial (fraccionamiento subcelular)**

El aislamiento de las mitocondrias para el posterior análisis de las proteínas fue realizado mediante centrifugación diferencial. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS y cosechadas en una solución buffer TSE: Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, EDTA 0,1 mM. Luego fueron homogeneizadas con un homogeinizador manual (Pellet pestle motor homogeniser, Kontes) y centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos, a fin de remover los núcleos y restos de células. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 16.000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción mitocondrial (sedimento). La fracción mitocondrial fue lavada por única vez con solución amortiguadora TSE, centrifugada a 16.000 x g durante 15 minutos y luego resuspendida en la misma solución amortiguadora.

## **23. Análisis de proteínas**

### **a. Cuantificación de proteínas**

La cantidad de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford [401] usando BSA como estándar (NATOCOR).

### **b. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Las proteínas provenientes de lisados celulares totales o fracciones mitocondriales (20 µg) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) conforme a la técnica descrita por Laemmli [402]. Se realizaron geles



planos de poliacrilamida entre placas de vidrio, utilizando el sistema MiniProtean III System de BioRad. El gel separador se preparó con acrilamida 10% ó 12%, bisacrilamida 0,22% en Tris-HCl pH 8,8 0,375 M conteniendo SDS 0,1%. La composición del gel concentrador fue acrilamida 5% y bisacrilamida 0,136% en Tris-HCl pH 6,8 0,125 M conteniendo SDS 0,1%. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en solución de siembra conteniendo Tris- HCl pH 6,8 62 mM, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1% como indicador del frente de la corrida electroforética y luego, fueron hervidas durante 5 minutos. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente en solución buffer Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, glicina 0,19 M y SDS 0,1%, aplicando voltaje constante de 80 V para el gel concentrador y 120 V para el separador. En todas las corridas se incluyeron mezclas de estándares de peso molecular: miosina, 200 kDa;  $\beta$ -galactosidasa 116 kDa; fosforilasa b 97 kDa; BSA 66 kDa; Ovoalbúmina 45 kDa; anhidrasa carbónica 29 kDa.

### **c. Western blot**

En esta técnica, las proteínas resueltas en el gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de PVDF como soporte inerte, la cual interacciona de forma no covalente con las proteínas. Luego, la proteína de interés fue detectada mediante el uso de anticuerpos que interaccionaron de manera específica con la misma.

Brevemente, luego de finalizada la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF en una solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl pH 8,3 25 mM, glicina 192 mM, y metanol 20%, a un voltaje constante de 2,4 mA/cm<sup>2</sup> durante 90 minutos. Finalizada la transferencia y para evaluar la eficiencia de la misma, se tiñó el gel para detectar las proteínas no transferidas con azul de Coomassie 0,1% disuelto en una solución acuosa conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. La decoloración se realizó por sucesivos pasajes en una solución conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. La visualización de las proteínas transferidas a las membranas se realizó sumergiendo las mismas en una solución de Ponceau S (Ponceau S 0,2% en ácido acético 1%) durante 10 minutos removiendo luego el colorante no unido a proteínas por sucesivos lavados con metanol.

Las membranas fueron luego incubadas en TTBS y leche en polvo libre de grasas al 5% o BSA al 1% (solución de bloqueo) durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego de este procedimiento, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con las diluciones apropiadas del anticuerpo primario en su correspondiente solución de bloqueo: anticuerpo

policlonal anti-ACSL4 obtenido en conejo, 1/1.000 en leche al 5%; anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina, 1/4.000 en BSA al 1%; anticuerpo monoclonal anti-subunidad 2 del complejo III de la cadena respiratoria, 1/10.000 en BSA al 1%; anticuerpo monoclonal anti-GAPDH, 1/4.000 en BSA al 1%. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos cada vez en TTBS y, para el caso del anticuerpo anti-ACSL4, se bloqueó nuevamente con leche descremada al 5% en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-IgG de conejo obtenido en cabra conjugado con peroxidasa (1/5.000 en TTBS) para los anticuerpos primarios policlonales o anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con peroxidasa (1/5.000 en TTBS) para los anticuerpos primarios monoclonales. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un último lavado de 10 minutos con TBS. Finalmente, la señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham Pharmacia) y autorradiografía.

#### **d. Inmunocitoquímica de fluorescencia**

Se analizó la expresión de la enzima ACSL4 en astrocitos y células C6 utilizando la técnica de inmunocitoquímica de fluorescencia. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos sobre *coverslips* tratados previamente con Poli-L-lisina. Una vez alcanzado aproximadamente un 80 % de confluencia, se retiraron los *coverslips* y se lavaron las células con buffer PBS. A continuación, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 4 % y sacarosa 5 % pH 7,3 durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, los *coverslips* fueron incubados con solución de bloqueo (BSA 1%, Tritón X-100 0,3% en PBS) durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y luego, fueron incubados toda la noche en cámara húmeda a 4 °C con las diluciones apropiadas del anticuerpo primario policlonal anti-ACSL4 obtenido en conejo, 1/100 en solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con PBS, seguidos por incubación durante 1,5 h en cámara húmeda y oscuridad con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo rojo anti-IgG de conejo obtenido en cabra conjugado con Cy3 (1/400 en solución de bloqueo). Luego de 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS a temperatura ambiente, los preparados fueron incubados con el colorante de núcleos DAPI por 5 minutos en oscuridad en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, se lavaron los *coverslips* con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje

para fluorescencia (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Los preparados fueron analizados al microscopio Olympus BX 50 de epifluorescencia. En todos los ensayos se incluyeron controles omitiendo el anticuerpo primario. Las imágenes fueron tomadas a iguales tiempos de exposición.

## **24. Análisis de ARN**

Todos los procesos se realizaron con material y soluciones libres de ribonucleasas (ARNasas).

### **a. Obtención de ARN total**

Para la obtención de ARN total se utilizó el reactivo TRIzol® (Gibco) siguiendo la técnica recomendada por el fabricante. Las células en cultivo en monocapa cultivadas en pocillos con un área de 9,5 cm<sup>2</sup> en una densidad de aproximadamente 4 x 10<sup>6</sup> células/pocillo, se lisaron mediante el agregado de 1 ml de TRIzol® y disrupción mecánica con pipeta automática. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se adicionó 0,2 ml de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) por cada ml de TRIzol® utilizado inicialmente, y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Luego de incubar 2 a 3 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C, obteniendo finalmente una fase inferior fenólica y de color fucsia, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El ARN permanece exclusivamente en esta última fase, por lo que se transfirió la misma a un tubo nuevo y se adicionó 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada 1 ml de TRIzol® utilizado. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El ARN pudo observarse como un precipitado blanco-gelatinoso en el fondo del tubo. Descartado el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol al 75% (1 ml/ml TRIzol®) y se secó al aire durante 10 minutos. Luego se resuspendió en H<sub>2</sub>O, tratada con di-etil-pirocarbonato (DEPC) para eliminar ARNasas y se incubó durante 10 minutos a 55-60°C para lograr una completa disolución.

La cuantificación del ARN fue llevada a cabo espectrofotométricamente utilizando una dilución 2:500 de la muestra en agua y medida a 260 y 280 nm, obteniéndose en todos los casos una relación de absorbancias a 260/280 > 1,7.

#### **b. Tratamiento del ARN con desoxirribonucleasa I (ADNasa I)**

Para eliminar cualquier contaminación del ARN obtenido con ADN, que podría introducir falsos positivos en los resultados, se trataron todas las muestras de ARN con desoxirribonucleasa I (ADNasa I), siguiendo las recomendaciones del comerciante. Brevemente, 10 µg de ARN se trataron con 1 U de ADNasa I (1 U/µl) en la solución de reacción de la enzima (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 50 mM) en un volumen final de 10 µl. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, para inactivar a la enzima, se agregó en la mezcla de reacción EDTA hasta una concentración final de 2 mM y se calentó a 65°C durante 10 minutos. Así, las muestras de ARN quedaron listas para su transcripción reversa.

#### **c. Reacción de transcripción reversa (RT)**

Para estas reacciones se utilizó la transcriptasa reversa derivada del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT o Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), que es una retrotranscriptasa que puede utilizarse para sintetizar ADNc a partir de templates de ARNm largos (> 5kb).

Para realizar la transcripción reversa (RT) de los ARNm se utilizaron 2 µg de ARN total tratado con ADNasa I y 0,5 µg de cebadores al azar (random primers). Estos cebadores están formados por seis nucleótidos con secuencias aleatorias de las bases A, T, C y G, y se utilizan en forma universal para la transcripción reversa. Esta mezcla se lleva a un volumen de 15 µl con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. La mezcla fue incubada 10 minutos a 70°C para desarmar las estructuras secundarias del ARN, y luego fue colocada rápidamente a 4°C durante 1 minuto. Se le adicionaron 10 µl de una mezcla de reacción conteniendo 200 U de la enzima M-MLV RT, 1,25 mM de cada dNTP, 25 U del inhibidor de RNasas RNasin® en la solución de reacción de la enzima (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y DTT 10 mM). Luego las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C. De esta manera se generaron los ADNc de los ARNm.

#### d. PCR semicuantitativa

Se llevó a cabo una reacción estándar de amplificación del ADNc en una solución buffer conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, BSA 0,1 mg/ml, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 50 pmoles de cada cebador, 1,25 U de Taq ADN polimerasa y 0,1 µg de ADN templado en un volumen final de 50 µl. El número de ciclos utilizado en esta técnica semicuantitativa, fue optimizado para cada ADNc realizando una curva de número de ciclos. Para ello, luego de realizar amplificaciones de una misma muestra con un mismo par de cebadores específicos durante diferente número de ciclos, los productos fueron resueltos en gel de agarosa. Las intensidades de las bandas fueron evaluadas, y se graficaron en función del número de ciclos en un gráfico semi-logarítmico. La fase geométrica de la PCR es el rango de ciclos donde la curva es lineal. Para comparar las cantidades de los fragmentos amplificados a partir de distintas muestras, se analizó la amplificación del ADNc de la proteína ribosomal L19 de cada una de ellas. Los niveles de expresión del ARNm del gen en estudio se normalizaron a los niveles de expresión del ARNm de L19 como control endógeno ya que la expresión de su ARNm se mantiene estable. La tabla 8 indica los cebadores utilizados en las PCR semicuantitativas realizadas.

Las condiciones generales de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	94°C – 5 minutos	
Desnaturalización	94°C - 30 segundos	} N° de ciclos (según indica la tabla 8)
Apareamiento	60°C - 30 segundos	
Elongación	72°C - 1 minuto	
Extensión	72°C - 10 minutos	

Los cebadores utilizados se indican en la tabla 8. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa. Se realizó una cuantificación de la intensidad de las bandas usando un analizador de imágenes computarizado GelPro analyzer (IPS, North Reading, MA, USA) y los resultados de la amplificación por PCR de cada muestra fueron normalizados con el ARNm de L19 como control interno.

**Tabla 8. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR semicuantitativas.** Se muestran sus T<sub>m</sub>. Para cada par de cebadores se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón) y el número de ciclos óptimo para la reacción. Las secuencias se indicaron en la tabla 3.

Nombre	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicón (bp)	Nº ciclos
ACSL4 humano directo	63	655	35
ACSL4 humano reverso	54		
L19 humano directo	56	500	26
L19 humano reverso	58		

#### e. PCR cuantitativa en tiempo real

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando el equipo Mic qPRC cyclor de Bio Molecular Systems. Previamente se obtuvo el ADNc de las muestras a analizar tal como se explicó previamente, salvo en las muestras obtenidas a partir del ensayo de ChIP las cuales se analizaron tal cual fueron obtenidas.

Cada reacción se realizó en 20 µl de solución que contenían 0,1 µg de ADN o ADNc, cebadores directos y reversos 10 µM y 10 µl de SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Las condiciones generales de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	95°C – 2 minutos	
Desnaturalización	95°C - 15 segundos	} 40 ciclos
Apareamiento	55°C - 15 segundos	
Elongación	72°C - 1 minuto	
Finalización	95°C – 15 segundos	

Los niveles de expresión del ARNm del gen en estudio se normalizaron a los niveles de expresión del ARN 18S, medición realizada en paralelo como control endógeno ya que la expresión de su ARNm se mantiene estable. Los datos de la PCR en tiempo real se

analizaron calculando el valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (método comparativo  $C_t$ ) para cada muestra experimental.

En el ensayo de ChIP la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó a partir del ADN obtenido en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico, los controles y el INPUT. Los resultados se expresaron como porcentaje del INPUT el cual se calculó teniendo en cuenta la proporción del INPUT con respecto a la muestra (1:100) utilizada en la reacción (Ver Ensayo de ChIP).

En primer lugar se obtuvo el valor del “Ct ajustado del INPUT”:

$$C_t \text{ ajustado del INPUT} = C_{t\text{INPUT}} - \log_2(100)$$

Luego se calculó el porcentaje del INPUT con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INPUT} = 100 \times 2^{(C_t \text{ ajustado del INPUT} - C_{t\text{muestra}})}$$

Los cebadores utilizados en PCR cuantitativa en tiempo real se indican en la tabla 9.

**Tabla 9. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.** Se muestran sus  $T_m$  y el tamaño del fragmento que amplifican cada par de cebadores (amplicón). Las secuencias se indicaron en la tabla 3.

Nombre	$T_m$ (°C)	Amplicón (bp)
ACSL4 Rata directo	56	189
ACSL4 Rata reverso	58	
StAR Rata qPCR directo	61	148
StAR Rata qPCR reverso	60	
18S Rata directo	58	299
18S Rata reverso	60	
ERRα ChIP directo	63	157
ERRα ChIP reverso	65	

## **25. Determinación de la concentración de progesterona en medio de cultivo**

### **a. Extracción de progesterona del medio de cultivo**

Para realizar la medición de neuroesteroides se modificó y puso a punto un método descrito para la extracción de esteroides de cerebro [403]. Para ello luego del tratamiento correspondiente, se recolectó el medio de cultivo de células incubadas en pocillos de 21 cm<sup>2</sup> y se cosecharon las células para la cuantificación de proteínas totales. El medio se diluyó al quinto con una fase móvil compuesta por una mezcla metanol:agua (1,5:10) y se extrajo utilizando columnas de fase reversa Strata C18-T mediante la aplicación de presión negativa. La elución de los componentes no polares de la muestra retenidos en la columna se realizó con 1 ml de éter, evitando con este solvente la co-elución del rojo fenol del medio con los componentes de la muestra, de manera que se elimina cualquier interferencia que pueda causar este colorante en posteriores determinaciones. El solvente se seca bajo atmósfera de nitrógeno y el residuo se redisuelve en 100 µl de una solución de colágeno 0,1% en PBS para la posterior cuantificación en la muestra de P4 por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

### **b. Cuantificación de progesterona en los extractos por la técnica de RIA**

Los extractos de los esteroides disueltos en 100 µl de colágeno 0,1% en PBS se incubaron durante toda la noche a 4°C con 100 µl de P4 radioactiva (10.000 dpm) y 100 µl de anticuerpo anti-P4 1/42.000 disuelto en colágeno 0,1% en PBS. Al cabo de este período los tubos fueron enfriados en agua/hielo y la hormona libre se separó de la unida al anticuerpo mediante la incubación con 200 µl de carbón activado 0,625% P/V durante 7 minutos a 4°C y posterior centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron rápidamente transferidos a viales de conteo a los cuales se les agregó 1 ml de solución centelladora Optiphase® para realizar las mediciones en un contador β de centelleo líquido 1214 Rackbeta.

## **26. Ensayo de migración celular**

La migración celular se evaluó por el ensayo de cierre de heridas [151, 404-407]. Para esto, células cultivadas en placas de 6 pocillos fueron incubadas hasta alcanzar un 90% de confluencia. Luego se realizaron las heridas utilizando una punta de pipeta de 10 µl. Las heridas fueron realizadas en forma de cruz para el correcto seguimiento de la misma



herida. Se monitorearon por obtención de imágenes a diferentes tiempos con un microscopio óptico modelo Olympus BX50 acoplado a una cámara digital Cool/Snap Proof Color PM-c35 donde se fotografiaron de 5 a 8 campos para cada tratamiento. Las heridas fueron medidas utilizando el programa Image-Pro Plus para luego determinar los porcentajes de cierre de heridas en cada tratamiento.

## **27. Ensayos de proliferación celular**

### **a. Ensayo de MTT**

La proliferación celular se analizó mediante el ensayo de reducción del MTT. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en una densidad de 4.000 células/pocillo en medio completo. Luego de 24 h se retiró el suero del medio con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Después de 24 h se realizaron los tratamientos correspondientes en medio completo y las células se incubaron durante 48 h más. A continuación, se agregó una solución de MTT (5 µg/ml en PBS) al medio de cultivo y se realizó una incubación a 37°C durante 150 minutos. Los cristales de formazán generados se disolvieron con 200 µl DMSO. Para disolver en forma completa estos cristales, las placas se agitaron vigorosamente durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de microplacas (Multidetecction microplate reader, Synergy HT, Biotek (Winooski, Vermont, USA).

### **b. Ensayo de incorporación de Bromo deoxiuridina (BrdU)**

La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de incorporación de BrdU utilizando el kit de Roche. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en una densidad de 1.200 células/pocillo en medio completo. Luego de 24 h se retiró el suero del medio con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Después de 24 h se realizaron los tratamientos correspondientes en medio completo y se incubaron las células durante 96 h más. A continuación, se realizó la determinación de la proliferación celular con el kit de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregó a cada pocillo BrdU 10 µM final y se incubaron las células 2 h a 37°C. Luego se removió el medio y se agregó la solución de fijación/desnaturalización provista por el kit. Se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se removió el líquido y se agregó la solución del anticuerpo conjugado anti-BrdU provista por el kit. Se incubó el anticuerpo por 90 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó tres veces el anticuerpo no unido con PBS. Se agregaron 100 µl del sustrato provisto por el kit y se incubó por 5 minutos a temperatura

ambiente. Se frenó la reacción con 25  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y luego se realizó una incubación de 1 minuto con agitación a 300 rpm a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Multidetecction microplate reader, Synergy HT, Biotek (Winooski, Vermont, USA)) y se utilizó como longitud de onda de referencia 690 nm.

## **28. Análisis estadístico**

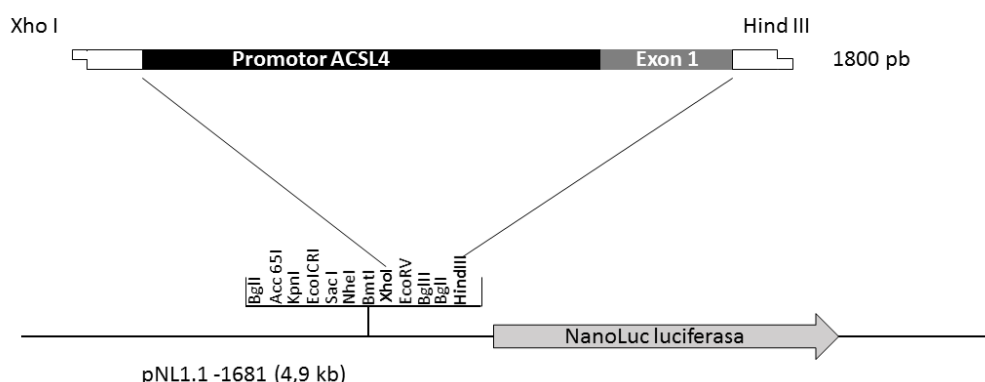
Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida del test de Tukey, a menos que se indique algo diferente en algún ensayo en particular. Se consideró significativa  $p < 0,05$ .

*Resultados*

## A. Caracterización funcional del promotor humano de ACSL4 en líneas de cáncer de mama

### A.1. Clonado, análisis y funcionalidad de la secuencia del promotor de ACSL4 humano

Para comenzar con los estudios del promotor del gen de ACSL4 humano se procedió al clonado de un fragmento de dicho promotor obtenido previamente en el laboratorio. Dicho fragmento se obtuvo a partir de ADN genómico humano por amplificación por PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pfu, Promega) y cebadores adecuados. El fragmento de 1,8 kb contiene además del promotor la mayor parte del exón uno que no incluye la secuencia dadora y aceptora de splicing. El fragmento fue clonado en el sitio de clonado múltiple del vector pNL1.1 de Promega, entre los sitios correspondientes a las enzimas de restricción XhoI y HindIII río arriba del gen reportero NanoLuc Luciferasa (Promega) (figura 19). La secuencia del fragmento clonado se muestra en la figura 20.



**Figura 19. Esquema de la estrategia de clonado del promotor humano de ACSL4 en el vector pNL1.1**

Para corroborar que el plásmido obtenido fuera el de interés, se realizó un mapa de restricción, sometiendo el producto a una digestión con XhoI y HindIII. Como resultado se obtuvieron dos bandas, una de alrededor de 3 kb y otra de alrededor de 1,8 kb, verificando que el vector pNL1.1 contenía el fragmento de tamaño esperado (figura 21). Para identificar

la secuencia del inserto, se secuenció el plásmido (servicio realizado por Macrogen Inc.) obteniendo como resultado la secuencia correcta del promotor de ACSL4 humano. A partir de este momento denominaremos al plásmido con el inserto de 1,8 kb del promotor humano de ACSL4 pNL1.1 -1681, indicando en su nombre la posición de la secuencia en la cual comienza el inserto.

```

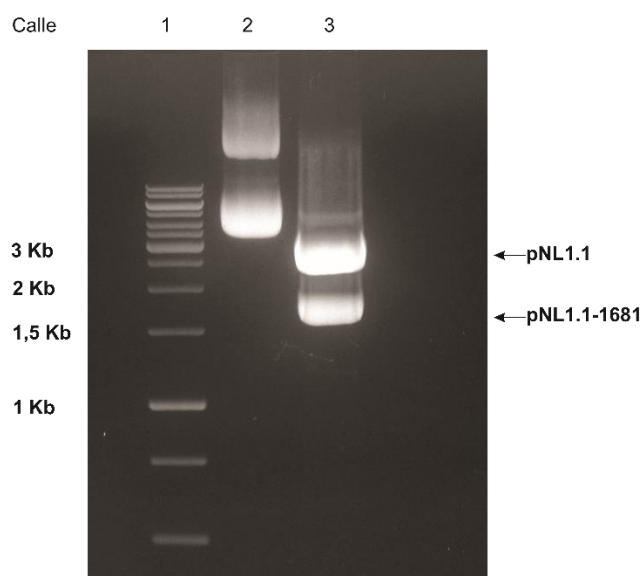
-1681 TGGGCTAAGAGACCGACAATAAAGGAACTGGCAAAAGTACTCTTTAATTACAAGTTCTTTT
-1618 CATCTTCATCCAGCACACTGATTTATGTGCTACACTGGGTTTGTATTATATCTATATTTTAAT
-1555 TCCACAAC TAGACACTA AACTTTATTGAGAACAGCGATATTCATTTCTTCAATTTCAATTTGTGT
-1492 TAACCAACTG TAGGTGATAGTGCTCTGTACATCATAGTTACCCAGTGAATTACGTACGTGAC
-1429 ATATGATTGCTTATTTCTGGTATTAAACAAGATTTCAAAAATAAACATGACAATTAAACTC
-1366 GTTGTTTGAAGTACTGAACTTTGTAGGTCAATCTTGAAAAGGAAGCTACATGACTGTCTTAG
-1303 CAATATTTATAGGTATATTATATGTAAGTGGTGGGTTTCTTGAAATTGAATTGGTAATATG
-1240 GCTTTAGAGTAGTAACACAAAACATATAGCTCTGTGCTCTCAGCTAACCACCTTTTAGTGTAC
-1177 CTGGGCTGCTTATTAATAATTCAAATTTCTTATCCCTACCCAGATCAGAATCAAAATACCTGG
-1114 GGGTTGTAGCTCCAGGTACCTACATTTCAACAAGCACCCAGATAATTGTGATGCACACTGAA
-1051 GAACTACTCTAGCTTGTAACTCTCAGGTGGTAAGGCATTTTATATATACATATATATACACA
-988 CACACAAGCACAAATGGTAATTCTATGGGAAATGGAAATCAGCAAGTGAAGTGAATGTCAA
-925 TTACCATCAGGAACAGGAAGCTAGTTCACCATTACGCATCAGGGAAGTGAAGAATTCTTGAG
-862 ATTTATTTTTTTGGGTGATATATTCTTGGCAGTTTATCAGGCCTCATTTGCAATTATGGTCTG
-799 TCCCTTTTGAAGCCCTCAGATAGTTCGCTGGCATTTTAATTTAATAGCAATTTCTTGCATCT
-736 GTTGGAACAGCATTCGTATGACCGCTTATAAGCAATGATCAGGGCTAGTAAGATGTCAAAA
-673 GCTGCGGTGACTTTTCCTTATCAGTTGGGGTTTTTTTGCCATGATACCATCGTGGAATGAA
-610 AGACAACGTGAAAATCCTGCGTCTTGTGATATTTATCAGTGGGAGTGAGCGGGGATCTTAA
-547 CGCAGTAAGAGGCAAGATAAACGGATGAGAGGCATTAGTTCAGGCTTACAGGAGCAAGATGCT
-484 TTTAGTCAAAGTGTCAAGATAGCTCTCTTAAAGAGGAGCAGTGAAACCCAAAAATGAGTGTC
-421 TTTTGAGGGCAGCTGGAAGATGACCCGAGGGGAACTTTATCCTGGGGTGGAGTCTGCGAAG
-358 CAAGCCGAGGTGAGGGCGTGGGCAATTCTGCGCCTCACTGCTGTTAGGCGCAAGGACATCC
-295 CGAAACACACTCAACGACACCAGCAGCGAGACTGACAGAAGCGGATCGCCAGCGGGAGCAACA
-232 ACTTGAGGCGAGCCGTTAGCCGCCTCGCCTTCTCGCAGCGCCCTCCCGCGCCCGGGAAGC
-169 CCGTTCGGCTCCGCCTTTTCGACTGACGTCCCGGGCGAGCGGGGCGGGCGCGTGGGTGGGCC
-106 GAGCCGTCTGCAGCCAGCGATTGCGCTGGCTCTGCCACACCACGCGCGCCCCGCTCCGCC
-43 GCCCCTCGGGCGCGCTCTTTCCGGGCTCGCGCTGAGTCCCGCCTCCGCCGGCTGTCCGGGTG
20 CGCGCGCGCCGCTGCGGCTTTTCTCTGGCCTCCGCGCGCGCTCCTCCTCGTCCCAGCGCTA
83 GCGGGCACGCGGTTCTTTTGGGAGCTTCCGAGTGCCA

```

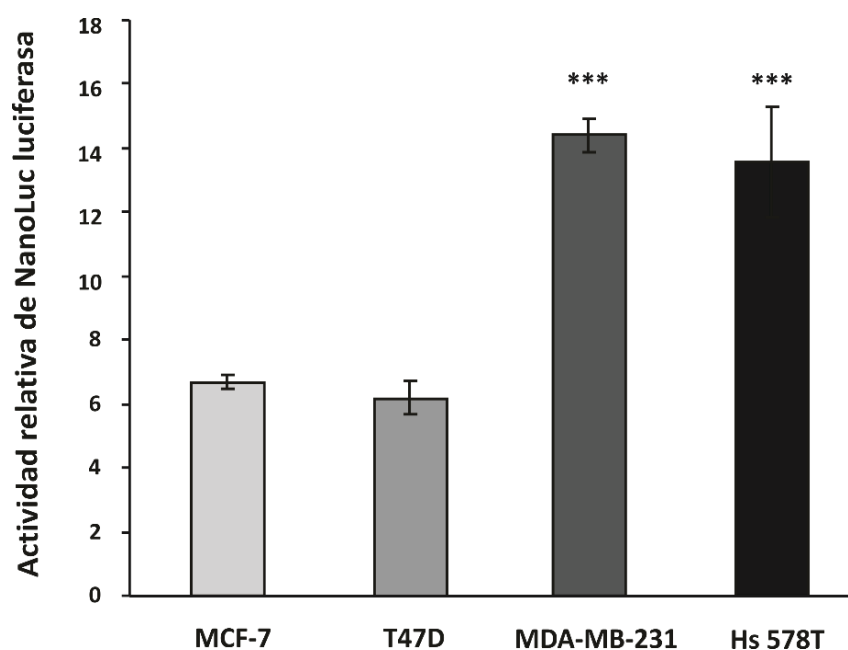
**Figura 20. Secuencia nucleotídica del promotor de ACSL4 humano y parte del exón uno.** La secuencia del exón uno contiene 123 bases y se señala en negrita. Se indica con una flecha el TSS tomado como +1 en este trabajo de tesis según la información obtenida de la base de datos Ensembl Genome Browser 91 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los números negativos indican las 1681 bases del promotor río arriba del TSS.

Con el fin de evaluar la funcionalidad del promotor se analizó la actividad del mismo. Para este análisis se transfectó transitoriamente el plásmido pNL1.1 -1681 en cuatro líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231 y Hs578T (que poseen elevada expresión de ACSL4 y son altamente agresivas) y MCF-7 y T47D (que poseen baja expresión de ACSL4 y menor agresividad).

Luego de 48 h de la transfección, se determinó la actividad de NanoLuc Luciferasa. La actividad de luciferasa en las células transfectadas con el plásmido pNL1.1 -1681 resultó ser significativamente mayor que en las células transfectadas con el plásmido vacío, siendo este aumento de alrededor de 6 veces en las líneas de baja agresividad y de 14 veces en las líneas de mayor agresividad (figura 22). Estos resultados permiten concluir que el promotor es funcional en todas las líneas estudiadas y que en las altamente agresivas el promotor tiene más del doble de actividad transcripcional que en las de baja agresividad. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente en el laboratorio con respecto a la expresión de la proteína y del ARNm de ACSL4 en dichas líneas celulares y muestran que la regulación transcripcional estaría implicada en la expresión diferencial.



**Figura 21. Análisis de la construcción pNL1.1 -1681 mediante mapa de restricción.** El plásmido pNL1.1 -1681 fue digerido con las enzimas de restricción XhoI y HindIII. A la izquierda de la primera calle, se muestran como referencia los tamaños de algunos fragmentos de los marcadores de peso molecular. Calle 1: Marcadores de Peso Molecular. Calle 2: pNL1.1 -1681 sin cortar. Calle 3: pNL1.1 -1681 cortado con ambas enzimas.

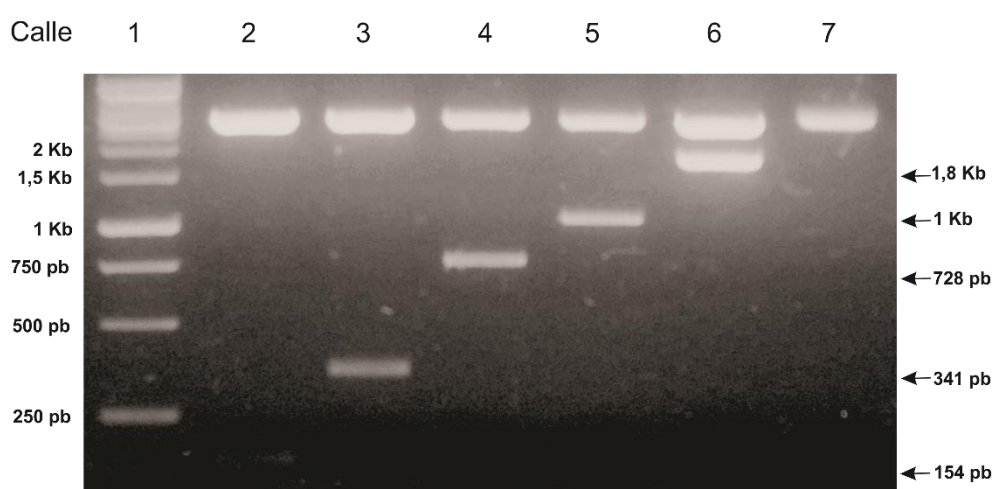


**Figura 22. Actividad del promotor de ACSL4 en líneas de cáncer de mama.** La construcción pNL1.1 -1681 se transfectó en las líneas de cáncer de mama Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7 y T47D. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. La actividad de NanoLuc Luciferasa se determinó por luminiscencia. La actividad del promotor se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc Luciferasa/fluorescencia de EGFP. Para la comparación entre líneas los resultados se expresan como la actividad relativa respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.001 vs MCF-7.

## A.2. Análisis de la actividad de delecciones unidireccionales 5' del promotor

Con el fin de caracterizar funcionalmente el promotor en las líneas de cáncer de mama se realizaron delecciones unidireccionales a partir del fragmento de 1,8 kb. El análisis de la actividad de los diferentes fragmentos obtenidos a partir del promotor permitió comparar la actividad de distintas zonas del mismo entre las líneas celulares. A partir de este análisis se identificaron elementos en la secuencia del promotor que podrían actuar en su regulación. Para estos ensayos se utilizaron como modelo de estudio las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

Se generaron cuatro construcciones contenidas dentro del vector pNL1.1, conteniendo distintas deleciones desde el extremo 5' del promotor, dejando fijo el extremo 3'. En primer lugar, se verificó a través de un mapa de restricción mediante la digestión con las enzimas XhoI y HindIII, que los plásmidos obtenidos tuvieran el tamaño correcto (figura 23). También se efectuó la secuenciación los insertos para chequear la identidad de los mismos. Las construcciones obtenidas se denominaron pNL1.1 -31, pNL1.1 -218, pNL1.1 -605 y pNL1.1 -873 indicando en su nombre la posición del promotor donde comienza la deleción.



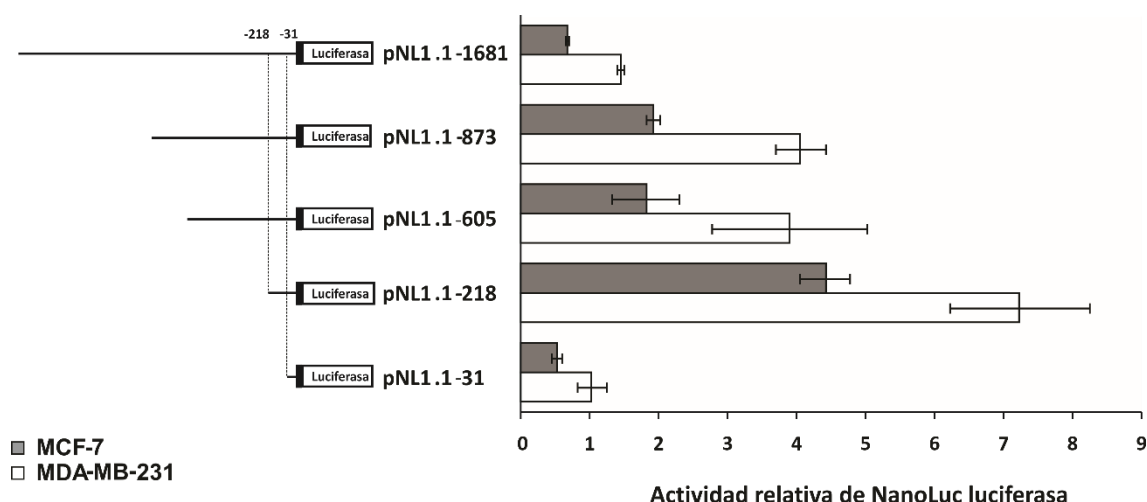
**Figura 23. Análisis mediante mapa de restricción de las construcciones conteniendo las deleciones unidireccionales 5' del promotor.** Las construcciones de las deleciones unidireccionales 5' del promotor de ACSL4 humano fueron digeridas con las enzimas de restricción XhoI y HindIII. A la izquierda de la primera calle se muestran como referencia los tamaños de los fragmentos correspondientes a los marcadores de peso molecular que se visualizan en la calle 1. A la derecha se indican los tamaños esperados de los distintos fragmentos del promotor clonados. La banda superior de todas las calles corresponde al plásmido vacío linealizado pNL1.1 (3,1 kb). Calle 1: Marcador de Peso Molecular (PM). Calle 2: pNL1.1 -31. Calle 3: pNL1.1 -218. Calle 4: pNL1.1 -605. Calle 5: pNL1.1 -873. Calle 6: pNL1.1 -1681. Calle 7: pNL1.1

Se transfectaron las distintas construcciones en células MCF-7 y MDA-MB-231 y luego de 48 h se evaluó la actividad de NanoLuc Luciferasa (figura 24). Los resultados en células de la línea MDA-MB-231 mostraron mayor actividad en todas las construcciones con respecto a la línea MCF-7 normalizando la actividad contra la luminiscencia basal.



Observamos similitudes y diferencias en la actividad de las construcciones entre ambas líneas. Los resultados se describen a continuación.

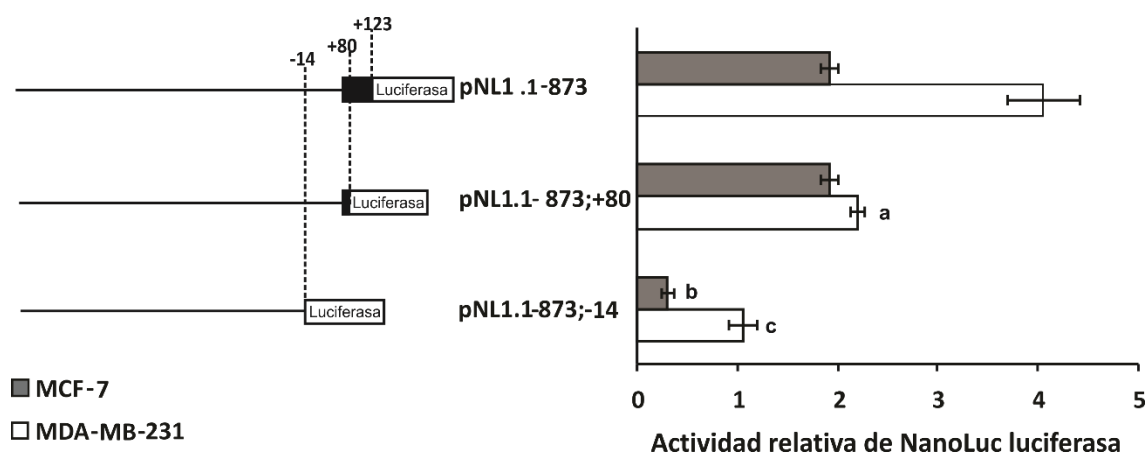
- La delección del extremo 5' del promotor, desde la posición -1681 hasta -873, aumenta 2,8 veces la actividad en ambas líneas celulares, sugiriendo que esta región contiene al menos algún elemento regulador negativo ( $p < 0,001$ ).
- La delección hasta la posición -605, no genera cambios significativos en la actividad del promotor, respecto a la delección anterior.
- La delección posterior hasta la posición -218 genera un aumento de la actividad del promotor en ambas líneas ( $p < 0,001$ ), siendo ésta la construcción que presenta mayor actividad. Sin embargo, esta delección genera un incremento diferencial de la actividad entre las dos líneas respecto a la delección anterior. En la línea MDA-MB-231 este aumento es de 1,8 veces, mientras que en la línea MCF-7 el aumento es de 2,4 veces. Estos resultados sugieren que entre las bases -605 y -218 existiría al menos un elemento regulador de la transcripción que actúa diferencialmente entre las dos líneas estudiadas.
- La delección entre -218 y -31, disminuye drásticamente la actividad transcripcional con respecto a la construcción anterior ( $p < 0,001$ ), llevando la actividad del promotor a valores de alrededor del 30% por debajo de los observados en el promotor completo, indicando que este fragmento contiene elementos que regulan positivamente la expresión basal del gen.



**Figura 24. Efecto de delecciones unidireccionales progresivas 5' sobre la actividad del promotor humano de ACSL4 en líneas MDA-MB-231 y MCF-7.** Se transfectaron en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 plásmidos conteniendo delecciones progresivas del extremo 5' del promotor (pNL1.1-31,-218,-605,-873,-1681) clonadas en el marco de lectura del gen de NanoLuc luciferasa. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. La actividad de las diferentes delecciones del promotor se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. Para la comparación entre líneas los resultados se expresan como la actividad relativa respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. También se muestran las posiciones -218 y -31 del promotor.

### A.3. Análisis de la actividad de delecciones unidireccionales 3' del promotor

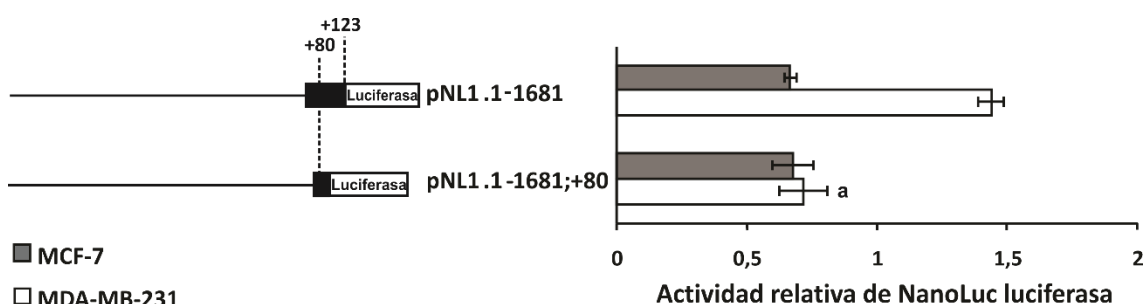
Se generaron dos construcciones del plásmido pNL1.1 conteniendo delecciones desde el extremo 3' del fragmento del promotor contenido en pNL1.1 -873, dejando fijo el extremo 5'. A las dos construcciones obtenidas se las denominó pNL1.1 -873;-14 y pNL1.1 -873; +80, indicando así la extensión del fragmento estudiado. Se verificaron el tamaño y la secuencia de las construcciones obtenidas mediante mapa de restricción y secuenciación de los fragmentos. La actividad de estas delecciones en la región 3' del promotor se evaluó mediante la transfección de los plásmidos generados en las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (figura 25).



**Figura 25. Efecto de delecciones unidireccionales progresivas 3' sobre la actividad de la construcción pNL1.1-873 en líneas MDA-MB-231 y MCF-7.** Una serie de plásmidos conteniendo delecciones unidireccionales progresivas 3' (pNL1.1-873, -873; +80, -873; -14) clonadas en el marco de lectura del gen de NanoLuc luciferasa se transfectaron en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. La actividad de las delecciones del promotor se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. Para la comparación entre líneas los resultados se expresan como la actividad relativa respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. También se muestran las posiciones -14 del promotor, +80 y +123 del exón uno. a,  $p < 0.001$  vs. pNL1.1-873. b y c,  $p < 0.001$  vs. pNL1.1-873; +80.

Los resultados muestran un perfil de actividad diferente en las dos líneas en estudio. La delección desde la posición +123 a +80, disminuye la actividad del promotor a la mitad sólo en las células MDA-MB-231, mientras que en las células MCF-7, esta delección no genera diferencias significativas. Lo observado sugiere que esa secuencia es importante para activar la transcripción del gen de ACSL4 en células MDA-MB-231. Una delección posterior hasta la posición -14 genera una caída en la actividad transcripcional del promotor en ambas líneas, siendo en MCF-7 más marcada que en MDA-MB-231 (15% y 50% respectivamente de la delección anterior). Resulta interesante destacar que la porción del fragmento del promotor comprendida entre las posiciones -873 y +80, posee una actividad similar en ambas líneas estudiadas.

A continuación, se analizó si la diferencia de actividad que ocurría al deletar el extremo 3' desde +123 a +80 en el pNL1.1 -873 se observaba también en la construcción que contenía la secuencia de 1,8 kb del promotor de ACSL4 humano. Para ello se generó una construcción que comprendió un fragmento entre las posiciones -1681 y +80 y luego de la transfección del plásmido se comparó su actividad con la del promotor de 1,8 kb en ambas líneas (figura 26)



**Figura 26. Efecto de la delección del extremo 3' sobre la actividad del promotor de ACSL4 humano en líneas MDA-MB-231 y MCF-7.** Células MDA-MB-231 y MCF-7 se transfectaron con el plásmido pNL1.1 -1681 o con la construcción pNL1.1-1681; +80 de la delección 3' del promotor. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. La actividad del promotor se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. Para la comparación entre líneas los resultados se expresan como la actividad relativa respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. También se muestran las posiciones +80 y +123 del exón uno. a, p<0.001 vs. pNL1.1 -1681.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en las delecciones sobre el plásmido pNL1.1 -873, ya que se observa que la delección del extremo 3' hasta la posición +80 en la secuencia de 1,8 kb del promotor, disminuye la actividad de la transcripción a la mitad sólo en MDA-MB-231 mientras que en MCF-7, esta delección no genera ningún efecto. También en este caso no se observan diferencias significativas en la actividad de la construcción pNL1.1-1681; +80 entre ambas líneas.

#### A.4. Análisis Bioinformático

Con el objetivo de identificar sitios consenso para factores de transcripción que podrían estar involucrados en la actividad del promotor de ACSL4 humano, se realizó un análisis bioinformático. Se analizó la secuencia del promotor humano de ACSL4 mediante el software Genomatix MatInspector (<http://www.genomatix.com>). Este nuevo análisis bioinformático del promotor determinó la ausencia de caja TATA en las inmediaciones del TSS. Esta característica podría traer como consecuencia que el gen de ACSL4 no tuviera un único TSS, y esto resultaría en distintos transcritos de longitud variable en el exón uno. Se realizó entonces una búsqueda sobre TSS descriptos y encontramos en la base de datos EnsemblGenome Browser 91 (<http://www.ensembl.org/>) tres transcritos con diferentes TSS (tabla 10).

**Tabla 10. Datos de diferentes transcritos humanos de ACSL4 obtenidos a partir de la base de datos Ensembl.**

Nombre	ID del transcripto	Longitud del transcripto	Longitud del exón 1	Isoforma	bp desde el codón ATG
ACSL4-201	ENST00000340800.6	5333	254	711 aa	505
ACSL4-202	ENST00000348502.10	5032	265	670 aa	327
ACSL4-204	ENST00000469796.6	5225	164	711 aa	397

El nucleótido que se tomó como +1 en este trabajo, corresponde al del transcripto denominado ACSL4-204. Se asigna a una citosina que se encuentra 397 pares de bases río arriba del codón de inicio ATG.

Se utilizó la herramienta MatInspector de Genomatix para la identificación de sitios consenso de factores de transcripción. Como resultado se obtuvo que el promotor en estudio contiene alrededor de 700 secuencias consenso para diferentes factores de transcripción. En base a recopilación bibliográfica y teniendo en cuenta un índice de corte mayor al 85% hemos seleccionado una serie de factores de transcripción que podrían estar relacionados con la regulación del promotor de ACSL4 humano en células de cáncer de mama (figura 27).

#	Family	Matrix	Start	End	Strand	Matrix sim.	Core sim.	Sequence
1	V\$ABDB	V\$HOXC13.01	11	27	+	0,915	1	gaccgacaaTAAAggaa
2	V\$IRFF	V\$ISRE.01	11	35	+	0,88	1	gaccgacaaTAAAggaa
3	V\$SORV	V\$SOX5.01	11	33	+	0,873	1	gaccgaCAATaaaggaaactggc
4	V\$CDXF	V\$CDX2.03	12	30	-	0,988	1	agtttctTATtgcgt
5	V\$ETSF	V\$ERG.02	16	36	+	0,955	1	acaataaaGGAActggcaaa
.....								
188	V\$RXRF	V\$THRB.01	326	350	-	0,772	1	aagattGACtcaaaagttcagtac
189	V\$MYT1	V\$MYT1.02	327	339	-	0,89	1	acaAAGTttagta
190	V\$PERO	V\$PPARG.03	327	349	-	0,844	1	agattgacctacAAAGttcagta
191	V\$RORA	V\$RORA1.01	332	356	+	0,952	1	aactttgtaGGTcaatctgaaaaa
192	V\$IRFF	V\$ISRE.01	344	368	+	0,815	0,75	caatctgaaaaagGAAGctacatg
193	V\$ETSF	V\$PEA3.01	349	369	+	0,966	1	ttgaaaaAGGAagctacatga
.....								
523	V\$ESRR	V\$ESRRA.03	1365	1387	+	0,912	1	gctgttaggcgcAAGGacatccc
.....								
577	V\$KLFS	V\$KLF.01	1547	1563	+	0,94	1	gcgagcgGGGcgggcg
578	O\$XCPE	O\$XCPE1.01	1549	1559	+	0,801	1	gaGCGGggcg
579	V\$KLFS	V\$KLF6.01	1550	1566	+	0,991	1	agcgGGGcgggcggt
580	V\$SP1F	V\$SP1.01	1550	1566	+	0,977	1	agcgGGGcgggcggt
581	V\$NRF1	V\$NRF1.01	1551	1567	+	0,783	0,75	acggGGGcgggcggt
.....								
660	V\$ZF5F	V\$ZF5.02	1699	1713	+	0,977	1	gtcgCGCGcgccgc
670	V\$E2FF	V\$E2F2.01	1700	1716	+	0,901	1	tcgCGCGCGcgctgc
671	V\$ZF5F	V\$ZF5.02	1700	1714	-	0,903	1	acggCGCGcggeaa
.....								
678	V\$EBOX	V\$MYCMAX.03	1733	1749	+	0,941	1	tcgCGCGCGGctcttc
679	V\$E2FF	V\$E2F2.01	1734	1750	+	0,88	1	ccgCGCGCGctcttc
680	V\$HESF	V\$HES1.01	1734	1748	+	0,94	0,944	ccgCGCGCGCctct
.....								
693	V\$E2FF	V\$E2F.02	1778	1794	-	0,844	0,857	aaagctcgCAAAagga
694	V\$MYT1	V\$MYT1L.01	1784	1796	-	0,95	0,909	ggaaAGCTgcga
695	V\$LTFM	V\$LACTOFERRIN.01	1795	1803	-	0,897	1	gGCACtcgg

**Figura 27. Resultados de elementos en cis sobre el promotor de ACSL4 obtenidos mediante el software Genomatix.**

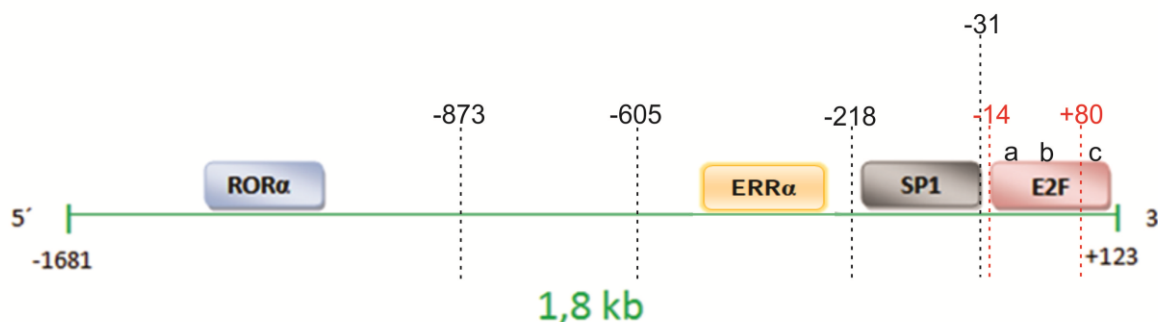
Entre ellos se encontraron dos sitios de unión para el factor de transcripción Sp1, uno localizado entre las posiciones -130 y -110, y otro entre las bases -53 y -37.

Dentro de la región 5' del promotor se encontró un sitio consenso para el factor de transcripción Retinoid-related orphan receptor alpha (ROR $\alpha$ ). Este factor de transcripción recluta hacia los genes diana una serie de coactivadores o correpresores transcripcionales que modulan la estructura de la cromatina para inducir o reprimir la transcripción [408-410]. El factor de transcripción ROR $\alpha$  se expresa en el tejido mamario normal y está involucrado en la inhibición de la proliferación de células epiteliales mamarias [411]. Los niveles de ARNm de ROR $\alpha$  se encuentran disminuidos en cáncer de mama con respecto al tejido normal [412]. La secuencia consenso para este factor se halló en el fragmento comprendido entre las posiciones -1359 a -1326. Este sitio se encuentra, según lo observado en las delecciones unidireccionales 5', en una región que posee elementos potencialmente involucrados en la regulación negativa de la transcripción tanto en MDA-MB-231 como en MCF-7.

También se observó la presencia de sitios consenso para factores de transcripción de la familia E2F. Esta familia compuesta por nueve miembros está implicada en la regulación de la progresión del ciclo celular. Estas proteínas pueden actuar como inhibidores o activadores de la transcripción y poseen secuencias consenso similares [413]. Si bien en toda la extensión del promotor de ACSL4 se hallaron diez sitios consenso para la familia E2F, nos interesó estudiar tres de ellos que se ubican cerca del extremo 3' del promotor entre las posiciones +14 y +35, +52 y +69 y +97 y +113, que partir de ahora denominaremos E2F.a, E2F.b y E2F.c respectivamente. E2F.c se encuentra dentro de las 43 pares de bases que estarían implicadas en la regulación diferencial del promotor de ACSL4.

Se encontró en la secuencia del promotor humano de ACSL4 un sitio consenso para el factor de transcripción Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ). Este factor se encuentra relacionado estructuralmente al ER, pero se mantiene activo en ausencia de ligando [414]. Puede actuar como activador o como represor de la transcripción dado que recluta tanto a correpresores como coactivadores [415, 416]. Se une a sus propias secuencias consenso y también a las del receptor de estrógenos [417]. Puede aumentar o inhibir la respuesta a estrógenos de sus genes diana [418-421]. ERR $\alpha$  se expresa diferencialmente en células normales y cancerosas, y su alta expresión se considera un fenotipo negativo en el pronóstico del cáncer de mama [422, 423]. Es muy interesante destacar que se ha visto que se encuentra sobreexpresado en MDA-MB-231 y tiene baja expresión en MCF-7. También se ha comprobado que su inhibición reduce la migración celular de células MDA-MB-231 *in vitro* y el crecimiento de tumores *in vivo* [423]. La posición en la que se encontró la secuencia consenso de ERR $\alpha$  es entre las bases -317 y -293, justamente dentro de la zona mapeada a través de las deleciones 5' del promotor donde se observaron diferencias en el comportamiento de la actividad de luciferasa.

Un esquema de la ubicación de todos los factores de transcripción que se analizarán se indica en la figura 28.



**Figura 28. Esquema del promotor humano de ACSL4 y parte del exón uno.** Se recuadraron las posiciones de secuencias consenso de posibles factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de ACSL4. Con líneas punteadas negras se indican las posiciones de las delecciones 5' progresivas. Con líneas punteadas rojas se indican las posiciones de las delecciones 3' progresivas. Las letras a, b y c indican las posiciones de las secuencias consenso E2F.a, E2F.b y E2F.c respectivamente.

#### **A.5. Funcionalidad de las secuencias consenso para ROR $\alpha$ , Sp1, ERR $\alpha$ y la familia E2F en la regulación del promotor humano de ACSL4**

La caracterización funcional del promotor humano de ACSL4 en MDA-MB-231 y MCF-7 ha demostrado que entre las posiciones -1681 y -873 existe al menos un elemento regulador negativo de la transcripción en ambas líneas. Como se mencionó anteriormente, dentro de esta región se encuentra un sitio consenso para ROR $\alpha$ . Mediante la utilización del programa Genomatix se diseñó una mutación sobre la secuencia consenso de ROR $\alpha$  que elimina este sitio de unión y no afecta la unión de ningún otro factor ni genera ninguna nueva secuencia consenso. En base a este diseño, se realizó la mutación sitio dirigida sobre la construcción pNL1.1 -1681, denominando a la construcción mutante pNL1.1 –ROR $\alpha$ .

Dentro de la región comprendida entre las posiciones -218 y -31 la caracterización funcional determinó que existe al menos un elemento activador de la transcripción en ambas líneas. Como se mencionó anteriormente, dentro de esta región se encontraron dos sitios consenso para Sp1. Se diseñó una mutación sobre la secuencia consenso de Sp1 ubicada entre las posiciones -130 y -110 que eliminó ese sitio de unión. En base al diseño de esta mutación, se procedió a realizar la mutación sitio dirigida de la construcción pNL1.1 -1681.



El plásmido obtenido se denominó pNL1.1–Sp1. Por otra parte, no se logró encontrar ninguna mutación que eliminara el sitio de unión proximal para Sp1.

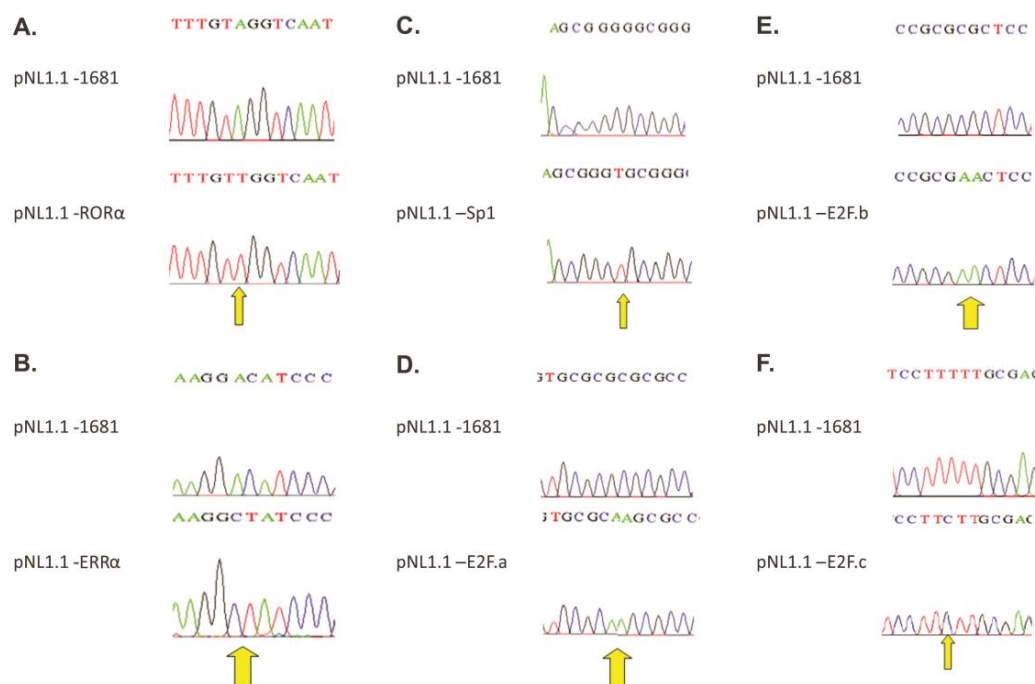
El sitio consenso de  $ERR\alpha$  en el promotor humano de ACSL4 se encontró dentro de una región con un comportamiento diferencial entre las líneas analizadas, específicamente entre las posiciones -317 y -293. Se diseñó entonces una mutación sobre la secuencia consenso de  $ERR\alpha$  que eliminó este sitio de unión y no afectó la unión de ningún otro factor ni generó ningún nuevo sitio consenso. Se realizó entonces la mutación sitio dirigida de la construcción pNL1.1 -1681. El plásmido obtenido se denominó pNL1.1 –  $ERR\alpha$ .

Mediante la utilización del programa Genomatix se diseñaron mutaciones sobre cada una de las secuencias consenso para la familia E2F ubicadas en el extremo 3' del promotor. Se obtuvieron los plásmidos pNL1.1 -E2F.a, pNL1.1 -E2F.b y pNL1.1 -E2F.c mediante mutaciones sitio dirigidas de la construcción pNL1.1 -1681.

Todos los plásmidos mutantes fueron verificados mediante secuenciación realizada por MacroGen Ltda (figura 29). Las construcciones mutantes obtenidas o la construcción salvaje pNL1.1-1681 fueron transfectadas en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 y luego se determinó la actividad del promotor (figuras 30 y 32).

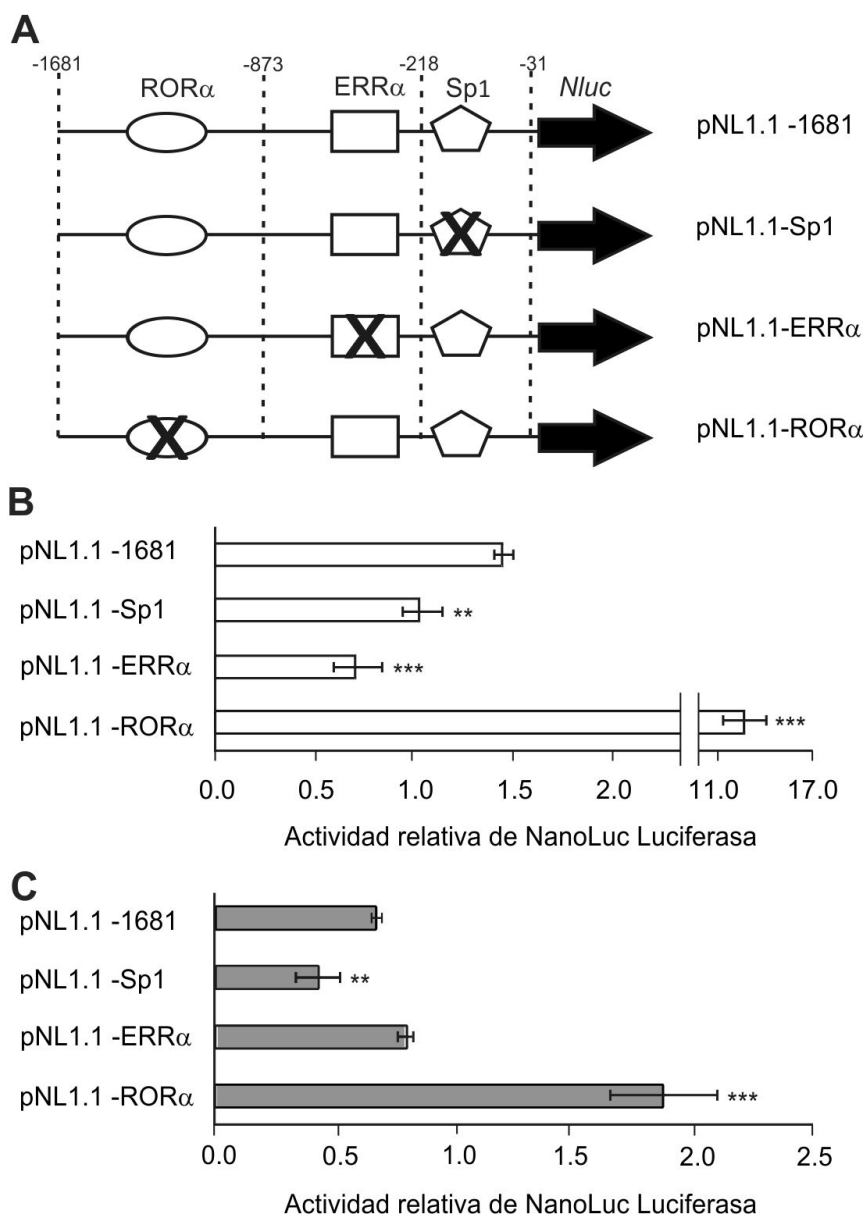
Como resultado se observó que la mutación del sitio para  $ROR\alpha$  produce un aumento de la actividad del promotor en ambas líneas, con lo cual en ambos tipos celulares estaría actuando como un regulador negativo de la transcripción. Esto coincide con lo observado en el análisis de la actividad de las deleciones del extremo 5' en base a la ubicación del sitio consenso para  $ROR\alpha$ .

La mutación de la secuencia consenso para Sp1, produce una disminución de la actividad del promotor en ambas líneas celulares. La magnitud de esta disminución en MCF-7 es de un 40%, y en MDA-MB-231 es de un 30%. Este resultado corresponde con lo observado mediante la construcción pNL1.1-218 en ambas líneas celulares.

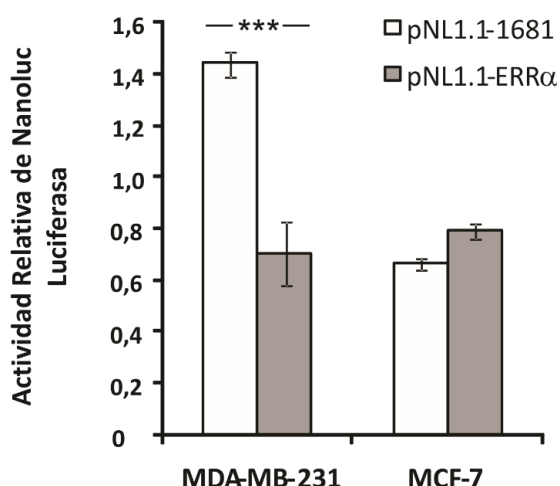


**Figura 29. Verificación por secuenciación de las construcciones mutantes obtenidas.** Se muestran los cromatogramas de las construcciones mutantes en comparación con la construcción salvaje. Las secuencias corresponden a los cromatogramas ubicados debajo de las mismas. Las flechas amarillas indican la/s bases que fueron mutadas. Mutaciones sitio dirigidas para los sitios consenso de: A. ROR $\alpha$ . B. ERR $\alpha$ . C. Sp1. D. E2F.a. E. E2F.b. F. E2F.c.

Fue muy interesante el resultado obtenido para la mutante del sitio consenso para ERR $\alpha$ . En este caso se observó que esta construcción activó la actividad del promotor únicamente en las células MDA-MB-231, ya que la mutación disminuye significativamente la actividad del promotor a la mitad con respecto a la construcción salvaje. En cambio, en las células MCF-7 la mutación de este sitio consenso no tiene ningún efecto, ya que no se encontraron diferencias significativas entre la construcción salvaje y la mutante para el sitio ERR $\alpha$ . De hecho, es muy interesante la comparación del efecto entre líneas, ya que la construcción mutante en MDA-MB-231 disminuye los niveles de actividad del promotor a valores similares respecto de la construcción salvaje en MCF-7 (figura 31).



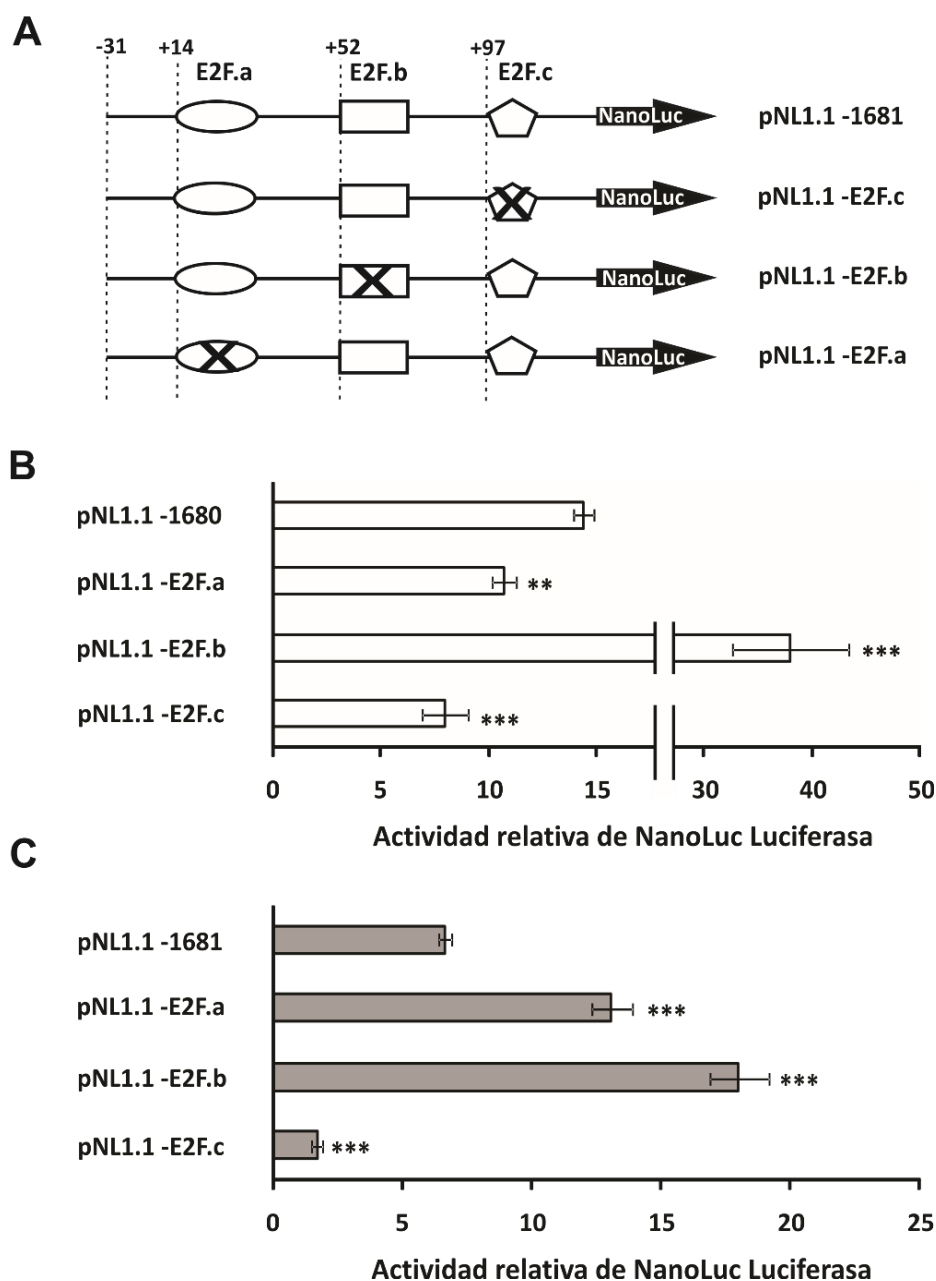
**Figura 30. Análisis del efecto de mutaciones sitio dirigida de secuencias consenso de distintos factores de transcripción en el promotor de ACSL4.** (A) Esquema de construcciones originadas por mutación sitio dirigida de las secuencias consenso de Sp1, ERRα y RORα (pNL1.1-Sp1, pNL1.1-ERRα y pNL1.1-RORα respectivamente) dentro de la construcción pNL1.1-1681. Las líneas punteadas marcan las posiciones -1681, -873, -218 y -31 del promotor. Las distintas construcciones y la del promotor salvaje se transfectaron en las líneas MDA-MB-231 (B) y en MCF-7 (C). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. La actividad de las diferentes construcciones transfectadas se representan como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. La actividad relativa se expresa como la actividad respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. pNL1.1-1681.



**Figura 31. Comparación de la actividad de las construcciones del promotor salvaje y mutante ERRα en MCF-7 y MDA-MB-231.** Se muestran los resultados de actividad de las construcciones del promotor salvaje y mutante para ERRα transfectadas en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7. La actividad de las construcciones transfectadas se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. Para la comparación entre líneas los resultados se expresan como la actividad relativa respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ .

En cuanto a las secuencias consenso de la familia E2F se ha observado que la mutación del sitio E2F.b genera un aumento de la actividad del promotor en ambas líneas, con lo cual este sitio consenso estaría actuando como represor en los dos modelos de estudio. En cambio, la construcción mutante para E2F.c, disminuye la actividad del promotor en ambas líneas, demostrando que este sitio sería un activador en las dos líneas de estudio. Más interesante es el caso del sitio E2F.a, el cual tiene un efecto activador en las MDA-MB-231 y actúa como un represor en las MCF-7.

Finalmente podemos destacar que las secuencias consenso para RORα, Sp1 y E2F están involucradas en la regulación de la actividad del promotor humano de ACSL4 en ambas líneas de cáncer de mama estudiadas, y que la secuencia consenso para ERRα está vinculada al aumento de la actividad del promotor sólo en MDA-MB-231.

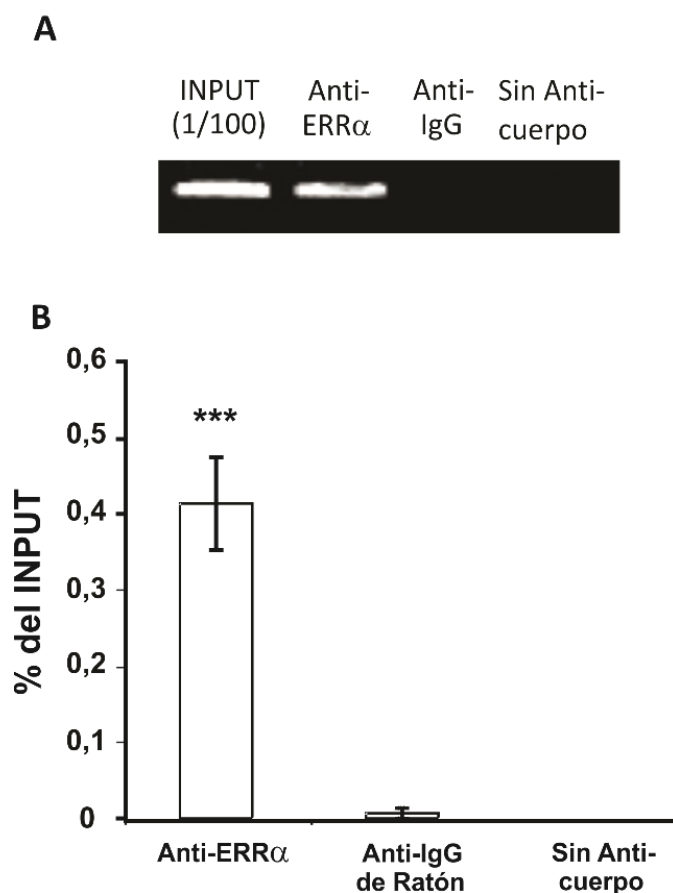


**Figura 32. Efecto de mutaciones sitio dirigidas de secuencias consenso de la familia de factores de transcripción E2F del promotor humano de ACSL4 sobre la actividad transcripcional.** (A) Esquema de mutantes originadas por mutación sitio dirigida de las secuencias consenso de E2F.a, E2F.b y E2F.c. (pNL1.1-E2F.a, pNL1.1-E2F.b y pNL1.1-E2F.c respectivamente) dentro de la construcción pNL1.1 -1681. Las líneas punteadas muestran las posiciones -14 del promotor, +80 y +123 del exón uno. Las construcciones se transfectaron en células MDA-MB-231 (B) y MCF-7 (C). Las células se incubaron a 37°C durante 48 h. La actividad de las construcciones transfectadas se representa como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. La actividad de las construcciones se relativizó respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. pNL1.1 -1681.

#### **A.6. Interacción del factor de transcripción ERR $\alpha$ con el promotor humano de ACSL4 en la línea MDA-MB-231**

En base a los resultados obtenidos mediante la mutación sitio dirigida de la secuencia consenso de ERR $\alpha$  y teniendo en cuenta lo encontrado en bibliografía sobre su rol en cáncer de mama, nos interesó verificar la interacción física de ERR $\alpha$  con el promotor de ACSL4 en MDA-MB-231. Para corroborarlo realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

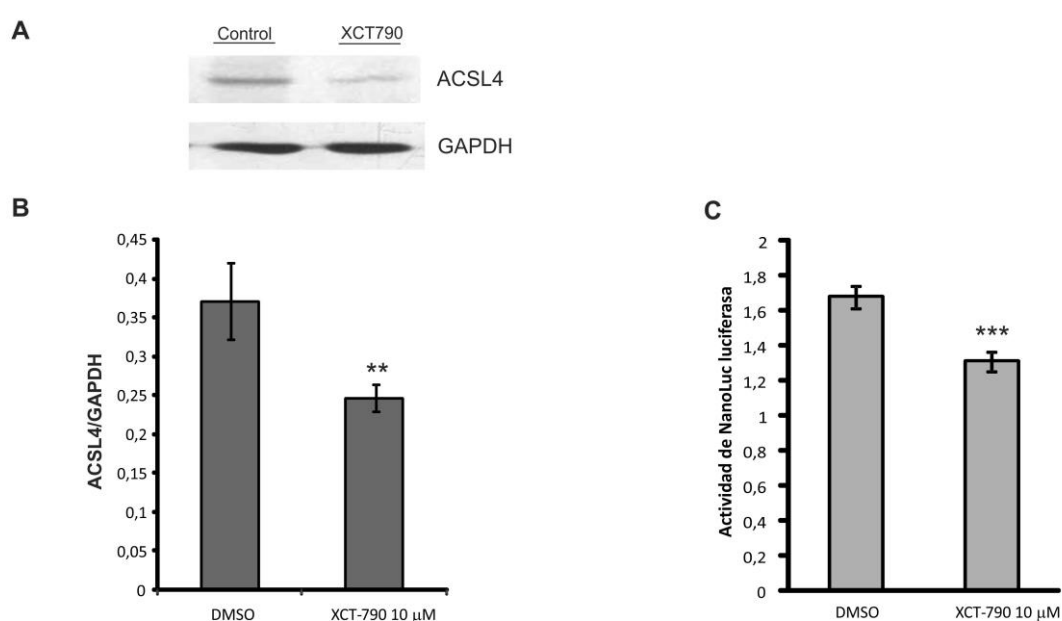
Se obtuvieron muestras de cromatina de células MDA-MB-231, como se detalló en la sección de materiales y métodos, las cuales se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo específico para ERR $\alpha$ . Como controles negativos se incubaron muestras de cromatina en presencia de IgG de suero normal o en ausencia de anticuerpos. Luego de la inmunoprecipitación las muestras se trataron como se describe en materiales y métodos con el fin de purificar el ADN genómico. Luego estas muestras y el ADN genómico sin inmunoprecipitar (INPUT) fueron utilizados para analizar la presencia de la secuencia promotora de ACSL4 a través de PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos. Los resultados obtenidos mediante la técnica de ChIP se muestran en la figura 33. Se observa un amplicón de 157 pares de bases cuando se utiliza como templado el ADN inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-ERR $\alpha$  o ADN de la muestra INPUT como control positivo. No se observó amplificación cuando se utilizó ADN obtenido de los controles negativos tanto en ausencia de anticuerpo como inmunoprecipitando con IgG de suero normal. Estos resultados demuestran la asociación específica de ERR $\alpha$  a la región proximal del promotor humano de ACSL4 (figura 33).



**Figura 33. Interacción del factor de transcripción ERR $\alpha$  con el promotor humano de ACSL4 en células MDA-MB-231.** Se llevaron a cabo ensayos de ChIP sobre muestras de cromatina de células MDA-MB-231 que se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ERR $\alpha$ . Los controles negativos de la inmunoprecipitación se realizaron en presencia o ausencia de anticuerpos IgG normal de ratón. El ADN purificado de estas muestras se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real utilizando cebadores específicos para la región promotora de ACSL4. (A) Los productos de PCR del INPUT (ADN de carga) y las muestras inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio. La imagen muestra un experimento representativo. (B) El nivel de amplificación de la secuencia del promotor de ACSL4 se expresa como % de la amplificación obtenida de la muestra INPUT. El % del INPUT de la muestra inmunoprecipitada con anti-ERR $\alpha$  y de los controles negativos se muestran en el gráfico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  vs. anti-IgG de ratón.

### A.7. Efecto de la inhibición de $ERR\alpha$ en la actividad transcripcional y en la expresión de ACSL4

Hasta aquí se ha demostrado que  $ERR\alpha$  se une al promotor humano de ACSL4 en células MDA-MB-231. Posteriormente, se quiso analizar el efecto de la inhibición de  $ERR\alpha$  por su agonista inverso XCT-790 [422, 423] sobre la expresión y la actividad transcripcional de ACSL4. Para ello, células MDA-MB-231 se incubaron en presencia de XCT-790 10  $\mu$ M ó DMSO como vehículo por 24 h.



**Figura 34. Efecto de la inhibición de  $ERR\alpha$  sobre la expresión y actividad del promotor de ACSL4 en MDA-MB-231.** (A) Células MDA-MB-231 se trataron con XCT-790 10  $\mu$ M o DMSO por 24 h. La expresión de ACSL4 y GAPDH como control de carga se analizó por Western Blot. La imagen muestra un Western Blot representativo. (B) El WB se cuantificó por densitometría y la densidad óptica integrada de ACSL4 se normalizó contra la expresión de GAPDH. (C) Células MDA-MB-231 se transfectaron con la construcción pNL1.1 -1681 y se trataron con XCT-790 10  $\mu$ M o DMSO por 24 h. La actividad de las diferentes construcciones transfectadas se representan como una relación de la luminiscencia de NanoLuc luciferasa/fluorescencia de EGFP. La actividad relativa se expresa como la actividad respecto a la media de la luminiscencia del plásmido vacío pNL1.1. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. DMSO.

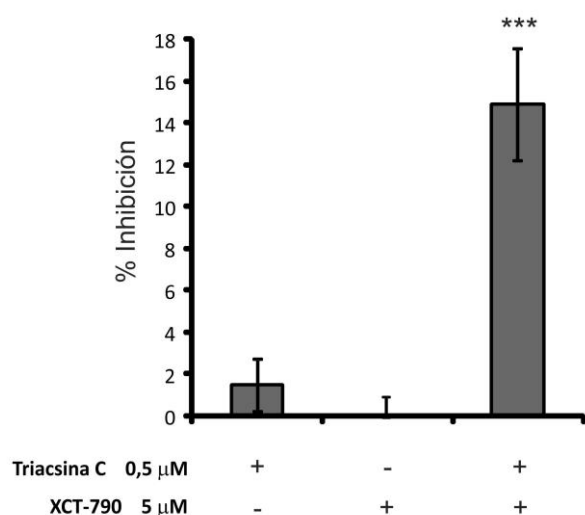


El análisis a través de Western blot mostró un descenso significativo en los niveles de expresión de ACSL4 en células MDA-MB-231 tratadas con XCT-790 (figura 34, A y B). Para evaluar el efecto del inhibidor sobre la actividad del promotor, la construcción pNL1.1-1681 se transfectó en células MDA-MB-231 y luego las células fueron incubadas en presencia de XCT-790 10  $\mu$ M o DMSO como vehículo por 24 h. Se observó un descenso significativo en la actividad del promotor en las células MDA-MB-231 tratadas con el inhibidor en comparación a las células controles (figura 34, C).

Esto sugiere que la inhibición de  $ERR\alpha$  disminuye la actividad del promotor humano de ACSL4 con la consecuente disminución de la expresión de ACSL4 en células MDA-MB-231.

#### **A.8. Efecto de la inhibición conjunta de ACSL4 y $ERR\alpha$ sobre la proliferación de la línea MDA-MB-231**

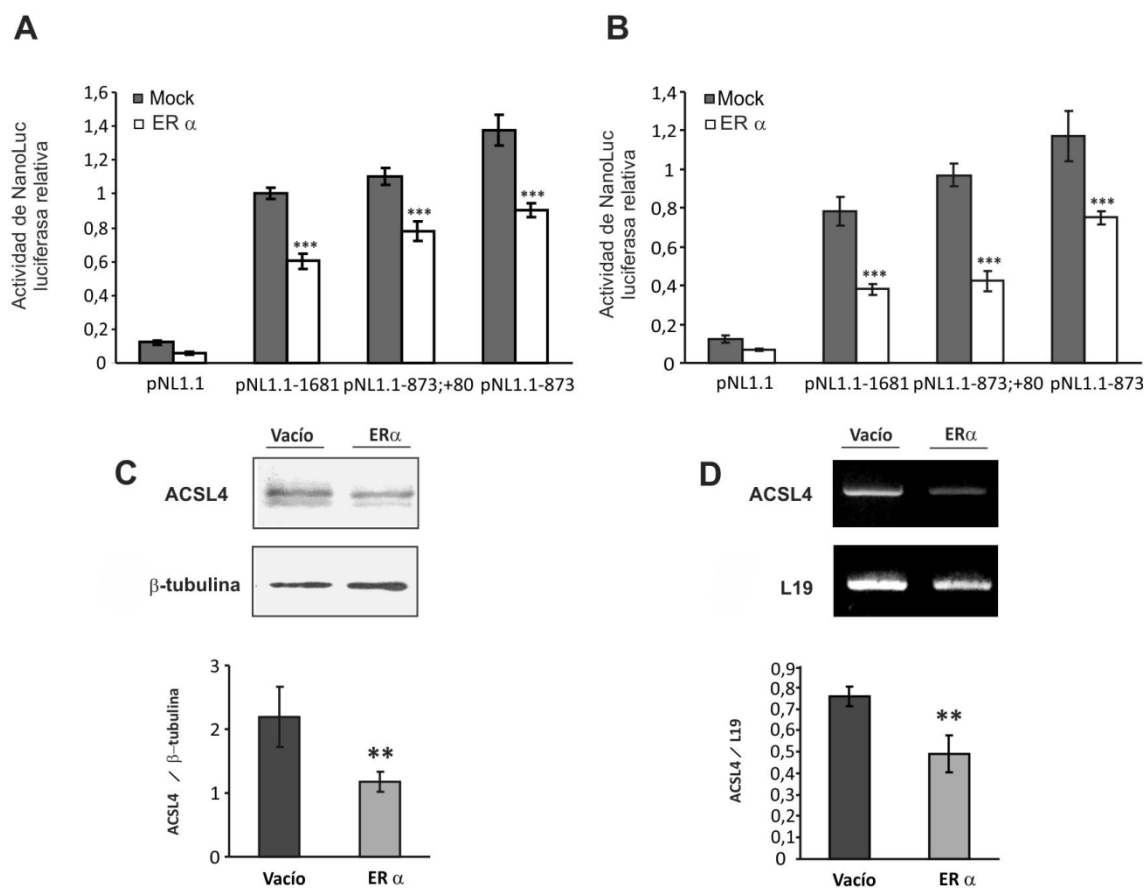
En base a los resultados obtenidos sobre la acción de  $ERR\alpha$  sobre la actividad transcripcional y la expresión de ACSL4, se quiso evaluar la potencia de la inhibición conjunta de  $ERR\alpha$  y ACSL4. Para ello se realizó un ensayo combinando las drogas XCT-790 y el inhibidor de ACSL4 Triacsina C, y se evaluó el impacto de esta combinación sobre la proliferación celular. Para ello se utilizaron concentraciones submáximas de ambos inhibidores en las cuales no hemos observado efectos significativos sobre la proliferación de la línea MDA-MB-231. Fue así como células MDA-MB-231 se incubaron con XCT-790 5  $\mu$ M, Triacsina C 0,5  $\mu$ M o una combinación de ambas drogas. En los controles se adicionó DMSO como vehículo. La proliferación celular se midió por incorporación de BrdU como se describe en Materiales y Métodos. La combinación de ambas drogas generó una inhibición significativa en la proliferación con respecto al control generando una inhibición que no había sido obtenida con las drogas ensayadas por separado (figura 35).



**Fig. 35. Inhibición de la proliferación celular mediante la combinación de dosis submáximas de inhibidores de ACSL4 y  $ERR\alpha$ .** Células MDA-MB-231 se sembraron en placas de 96 pocillos y 24 h antes del ensayo se retiró el suero del medio. Luego a las células se les cambió el medio por D-MEM alta glucosa completo suplementado XCT-790 (5  $\mu$ M) y/o Triacsina C (0,5  $\mu$ M) durante 96 h. Posteriormente, la proliferación celular se midió mediante ensayos de incorporación de BrdU como se describió anteriormente. Los datos se presentan como porcentaje de inhibición de la proliferación celular en comparación con las células control y se representan las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\*p <0.001 frente a inhibidores únicos.

#### A.9. Efecto de la restauración de la expresión del Receptor de Estrógenos sobre la expresión de ACSL4

En trabajos anteriores del laboratorio, se ha reportado *in vitro* e *in vivo* una correlación inversa de la expresión de ACSL4 con respecto a la de ER [149]. Esta correlación negativa en la expresión también ha sido comprobada en muestras de tumores de pacientes por Monaco [178]. Se demostró que el aumento de expresión de ACSL4 produce inhibición en los niveles de expresión del ER. Sin embargo, no ha sido analizado el efecto de la ausencia de expresión de ER sobre la expresión de ACSL4 en modelos TNBC. En el análisis bioinformático del promotor de ACSL4 humano, no se han hallado secuencias consenso para ER.



**Figura 36. Efecto de la expresión de ER sobre la actividad del promotor y expresión de ACSL4 en líneas MDA-MB-231 y Hs578T.** Construcciones diferentes del promotor humano de ACSL4 (pNL1.1 -1681, pNL1.1 -873;+80 y pNL1.1 -873) o el plásmido vacío pNL1.1 se cotransfectaron con un plásmido de expresión de ER (pSG5-ER $\alpha$ ) o el plásmido vacío pSG5 en células MDA-MB-231 (A) o Hs578T (B). Luego de 48 h se determinó la actividad de NanoLuc luciferasa. La actividad de las diferentes construcciones transfectadas se representan como una relación de la luminiscencia de NanoLuc Luciferasa/fluorescencia de EGFP. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. (C) Células MDA-MB-231 se transfectaron de manera transitoria con pSG5-ER $\alpha$  o el plásmido vacío y se incubaron por 48 h. La expresión de ACSL4 se analizó por Western blot y se cuantificó por densitometría. La figura muestra un Western blot representativo. La densidad óptica integrada de ACSL4 se normalizó contra la expresión de  $\beta$ -tubulina. (D) ARN total de células MDA-MB-231 transfectadas con pSG5-ER $\alpha$  o el plásmido vacío, fue utilizado como templado para analizar mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión de ACSL4. Los niveles de expresión fueron normalizados con los de la proteína ribosomal L19 (L19). Los productos de RT-PCR se resolvieron en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio, las bandas específicas se detectaron por transiluminación y se cuantificaron por densitometría. La figura muestra imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes y la correspondiente cuantificación de la densidad óptica integrada de ACSL4 normalizada contra las bandas correspondientes a L19. Los datos representan la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 vs. plásmido vacío.

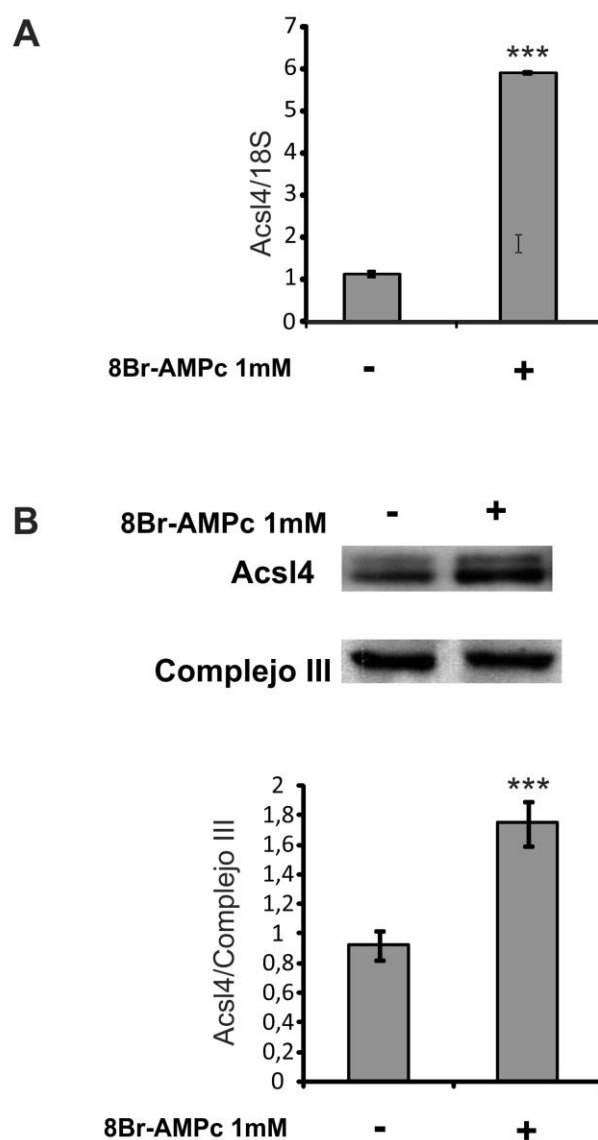
Para demostrar si existe un efecto de ER sobre la expresión de ACSL4, se restauró la expresión de este factor de transcripción en células de cáncer de mama TNBC y se analizó la actividad del promotor, transcripción y expresión de ACSL4. Para este objetivo se cotransfectaron el plásmido pSG5-ER $\alpha$  o su correspondiente plásmido vacío pSG5 en las líneas TNBC MDA-MB-231 y Hs578T con alguna de las siguientes construcciones del promotor humano de ACSL4: pNL1.1-1681, pNL1.1-873, pNL1.1 -873;+80 ó el plásmido vacío pNL1.1. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de ER en las líneas TNBC disminuyó la actividad de todas las construcciones del promotor de ACSL4 analizadas (figura 36). A su vez, la expresión de ER en células MDA-MB-231 disminuyó tanto los niveles de la proteína como del ARNm de ACSL4 tal como lo muestran los ensayos de Western Blot y de PCR semicuantitativa en la figura 36. De este modo, podemos inferir que este factor de transcripción disminuiría la actividad del promotor de ACSL4 influyendo en los niveles de transcripción y expresión.

## **B. Regulación y función de ACSL4 en células neuroesteroideogénicas**

En esta parte del trabajo de tesis se estudiará la regulación y función de ACSL4 en astrocitos y su relación con la neuroesteroideogénesis. Para estos estudios se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de cerebro de rata que producen P4 como principal neuroesteroide y también a la línea C6.

### **B.1. Expresión ACSL4 en astrocitos y su regulación por 8Br-AMPC**

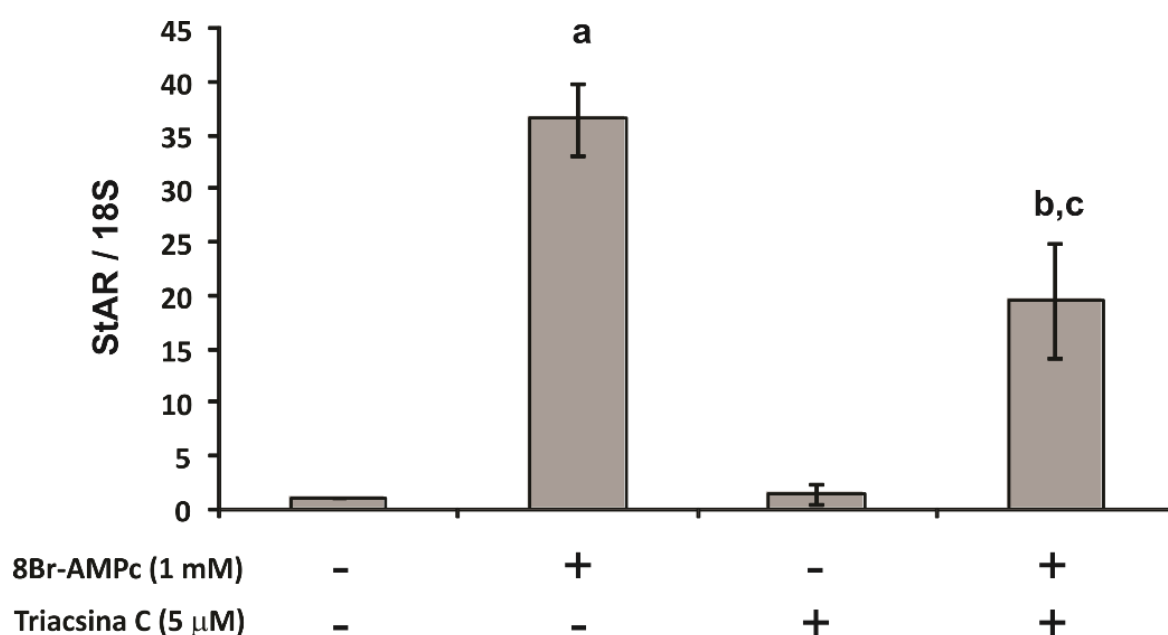
Con el objetivo de analizar la regulación de la expresión de ACSL4 por AMPc, cultivos primarios de astrocitos se incubaron en presencia o ausencia de 8Br-AMPC 1 mM durante 12 h. La expresión de ACSL4 se analizó por Western Blot y los niveles de ARNm fueron cuantificados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados muestran que el AMPc produce un aumento significativo tanto en la expresión de ACSL4 como en los niveles de su ARNm respecto de las células no tratadas (figura 37).



**Figura 37. Efecto del 8Br-AMPC sobre la expresión y los niveles de ARNm de ACSL4 en astrocitos de rata.** (A) Se aisló ARN total de cultivo primario de astrocitos tratados durante 12 h con o sin 8 Br-AMPC 1 mM y se realizó la reacción de transcripción reversa. Los niveles de expresión de ACSL4 fueron analizados por PCR en tiempo real. Se normalizaron los resultados utilizando los niveles de 18S ribosomal. (B) Lisados de mitocondrias aisladas de astrocitos tratados durante 12 h con o sin 8 Br-AMPC 1 mM se sometieron a western blot para ACSL4 y Complejo III. Las fotos muestran un western blot representativo. El gráfico muestra la cuantificación por densitometría en unidades arbitrarias de la expresión de ACSL4 con respecto a la de complejo III como proteína normalizadora. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.

## B.2. Regulación de la expresión del ARNm de StAR en células de la glía

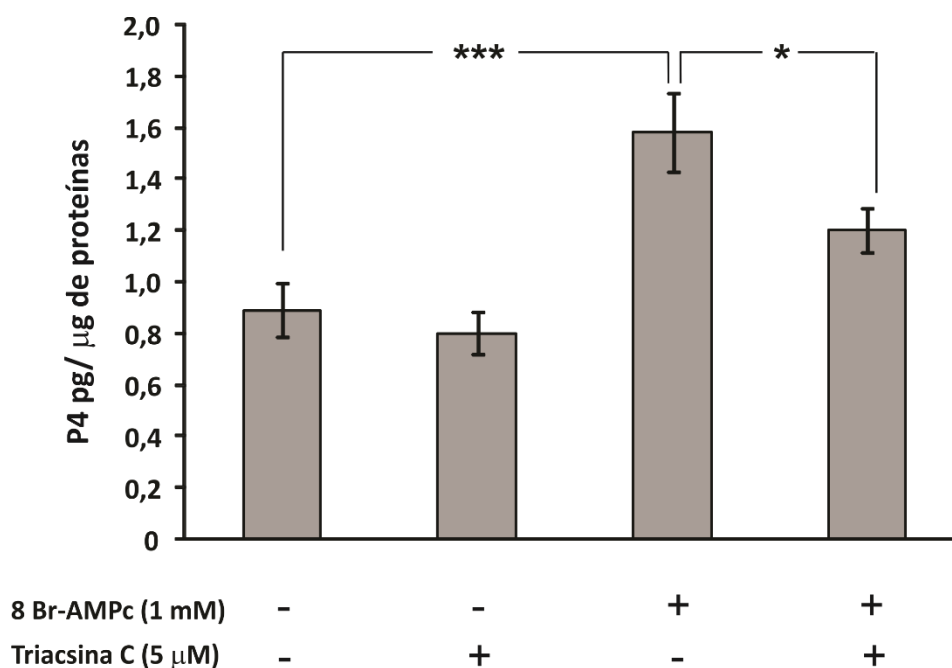
Se evaluó el rol de ACSL4 sobre la regulación de la expresión de StAR. Con este fin células de cultivo primario de astrocitos de rata tratados o no con Triacsina C como inhibidor ACSL4 se incubaron durante 12 h en presencia o ausencia de 8 Br-AMPc. Luego del tratamiento se obtuvo el ARN total que se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para StAR. Se observó que el 8 Br-AMPc incrementa significativamente la transcripción de StAR. La presencia del inhibidor de ACSL4, inhibe la inducción de StAR mediada por 8 Br-AMPc (figura 38).



**Figura 38. Efecto de la inhibición de ACSL4 sobre los niveles de ARNm de StAR.** (A) Astrocitos primarios de rata tratados con Triacsina C 5  $\mu$ M o con DMSO como vehículo se incubaron en presencia o ausencia de 8 Br-AMPc 1 mM por 12 h. Se aisló el ARN total y se realizó la reacción de transcripción reversa. Las muestras obtenidas se analizaron mediante PCR en tiempo real para la expresión de StAR. Se normalizaron los resultados utilizando los niveles de 18S ribosomal. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. a,  $p < 0.001$ ; b,  $p < 0.05$  vs. ausencia de inhibidor y estímulo. c,  $p < 0.05$  vs. 8Br-AMPc 1 mM únicamente.

### B.3. Rol de ACSL4 en la neuroesteroidogénesis en astrocitos de rata

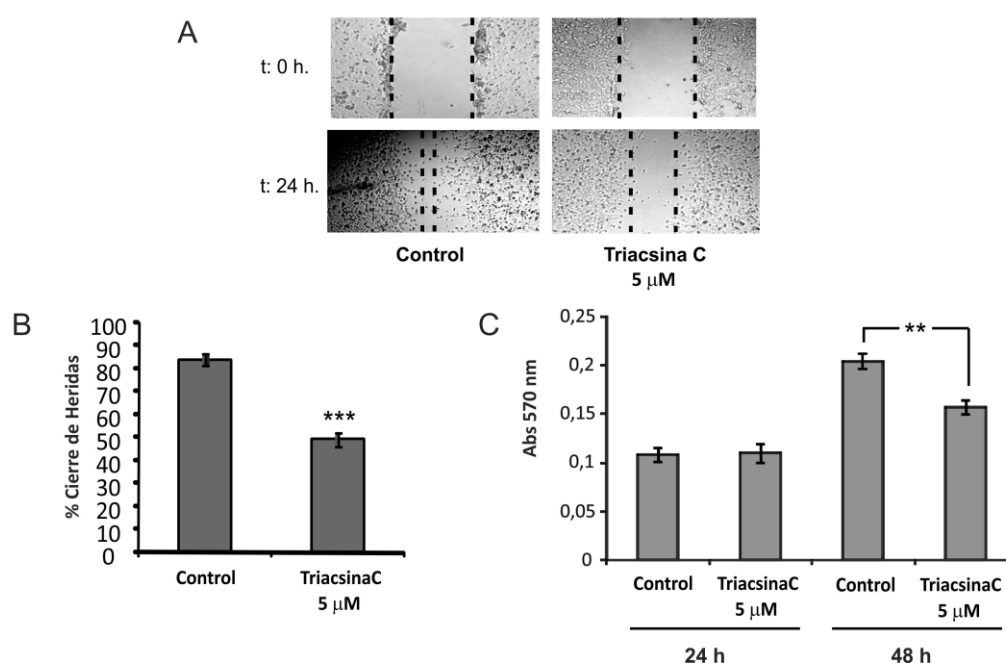
Para evaluar el rol de ACSL4 en la neuroesteroidogénesis, los cultivos primarios de astrocitos fueron incubados en presencia o ausencia de 8Br-AMPC 1 mM durante 24 h, utilizando el inhibidor de ACSL4, Triacsina C. Luego se extrajeron los esteroides y se cuantificaron los niveles de P4 por RIA tal como se detalló en Materiales y Métodos. Se observó que la incubación con 8Br-AMPC, produce un incremento significativo en la neuroesteroidogénesis. La presencia de Triacsina C, produce una disminución significativa de los niveles de neuroesteroides producidos frente a la estimulación con 8Br-AMPC (figura 39) sin producir cambios en los niveles basales.



**Figura 39. Efecto de la inhibición de ACSL4 sobre la producción de neuroesteroides inducida por 8Br-AMPC en cultivo primario de astrocitos de rata.** Astrocitos primarios de rata tratados con Triacsina C 5 μM ó con DMSO como vehículo se incubaron en presencia o ausencia de 8 Br-AMPC 1 mM por 24 h. Los esteroides producidos se extrajeron según se explica en materiales y métodos. El gráfico representa la relación del contenido de P4 medido por RIA con respecto al contenido total de proteínas totales. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias +/- SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\*P<0.001. \*P<0.05.

#### B.4. Rol de ACSL4 en la migración y proliferación en células de la glía

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado que ACSL4 tiene implicancia en la proliferación y migración de células de cáncer de mama. Para analizar el rol de ACSL4 en la migración celular de astrocitos se realizó el ensayo de cierre de herida. Con este fin los astrocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia se realizó una herida en los mismos tal como se indica en Materiales y Métodos. Luego se incubaron estos cultivos en presencia o ausencia de Triacsina C y se midió el cierre de la herida entre 0 y 24 h. Se observó una disminución significativa en el cierre de la herida en las células tratadas con el inhibidor de ACSL4 (figura 40 A y B).

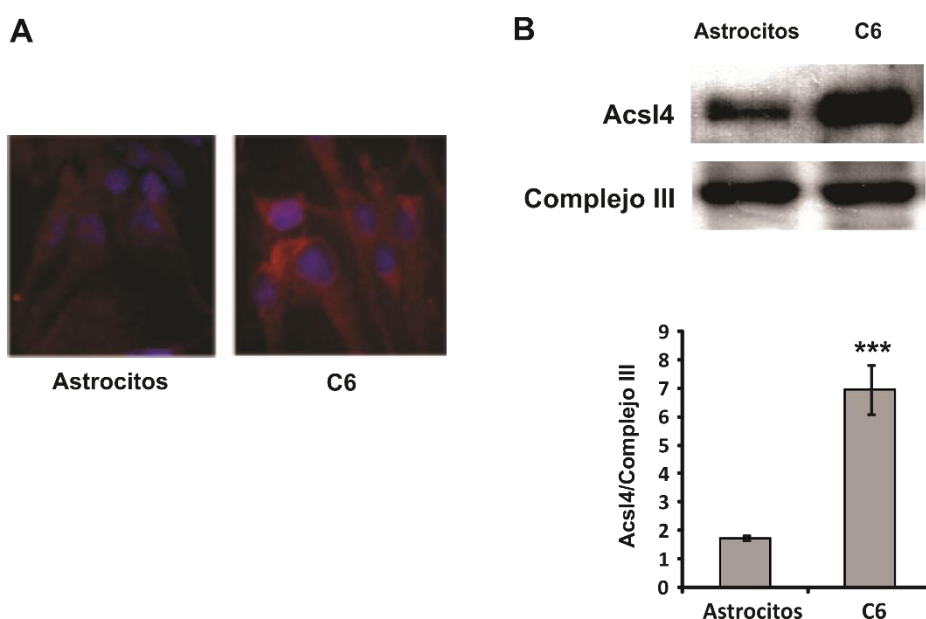


**Figura 40. Efecto de la inhibición de ACSL4 sobre la migración y proliferación celular en astrocitos.** Se evaluó la migración celular de astrocitos mediante ensayo de cierre de herida. Se realizó una herida en cultivo primario de astrocitos y posteriormente se incubaron con o sin Triacsina C 5  $\mu$ M durante 24 h. (A) Imágenes de un ensayo representativo a los tiempos 0 h y 24 h. (B) El gráfico muestra el porcentaje de cierre de heridas luego de 24 h de tratamiento. (C) Astrocitos en cultivo primario se incubaron con Triacsina C 5  $\mu$ M o con DMSO como control. Se determinó la proliferación celular a las 24 h y 48 h mediante ensayo de MTT. El gráfico muestra la proliferación medida en unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs control.



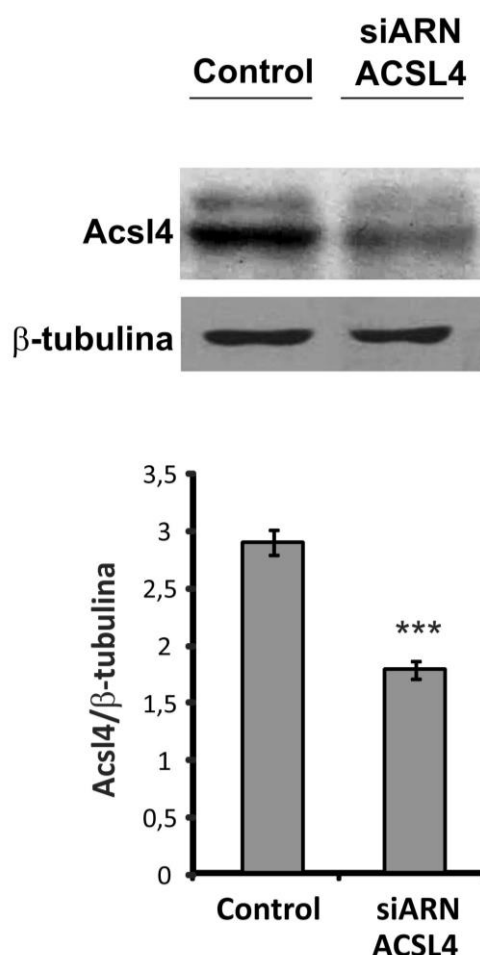
Para analizar el rol de ACSL4 en la proliferación de astrocitos se realizó el ensayo de MTT como se describió en Materiales y Métodos. Con este fin los astrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de Triacsina C y se determinó la proliferación luego de 24 h y 48 h. Se observó una disminución significativa de la proliferación en presencia de Triacsina C luego de 48 h de tratamiento mientras que a las 24 h no hubo diferencias significativas (figura 40 C).

Para continuar con estos estudios se utilizó otro modelo neuroesteroidogénico, la línea de glioma de rata C6. En primer lugar, se analizó la expresión de la enzima a través de Western blot e inmunocitoquímica (figura 41). Se observó por ambas técnicas que la expresión de ACSL4 es mayor en la línea C6 que en astrocitos de cultivo primario.



**Figura 41. Expresión de ACSL4 en astrocitos y línea de glioma C6 de rata.** Se analizó el contenido de ACSL4 en células de cultivo primario de astrocitos y de la línea de glioma C6. (A) Células de astrocitos y células C6 se sometieron a inmunocitoquímica para analizar la expresión de ACSL4. En las fotos la fluorescencia roja marca a ACSL4 y la azul a los núcleos teñidos con DAPI. (B) También se realizó en dichas células el aislamiento de la fracción mitocondrial que se utilizó para la determinación de la expresión de ACSL4 por Western Blot. Las fotos muestran un Western Blot representativo. El diagrama muestra la cuantificación por densitometría de unidades arbitrarias de la expresión de ACSL4 con respecto a la de Complejo III como proteína normalizadora. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$  vs control.

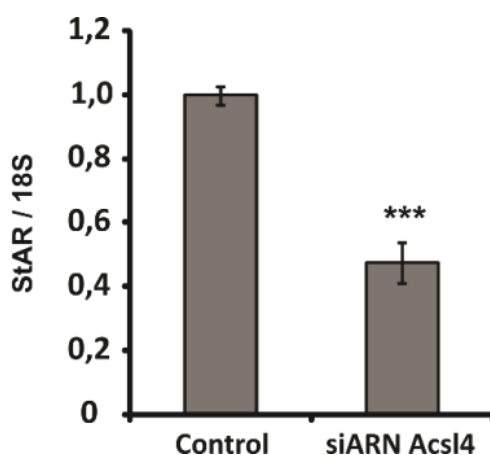
Con el objetivo de ampliar los estudios respecto de la función de ACSL4 utilizando células C6 generamos líneas que expresan en forma estable un siARN para ACSL4 como se detalla en Materiales y Métodos. La expresión de ACSL4 de las líneas obtenidas se verificó mediante la técnica de Western Blot (figura 42). Se observó que el siARN de ACSL4 produce la disminución significativa en los niveles de expresión de la proteína.



**Figura 42. Expresión de ACSL4 en las líneas estables generadas a partir de células C6.** Lisados totales de las líneas estables generadas a partir de células C6 “siARN ACSL4” y “Control” se sometieron a WB. Las fotos muestran un WB representativo. El diagrama muestra la cuantificación por densitometría en unidades arbitrarias de la expresión de ACSL4 con respecto a la de β-tubulina como proteína normalizadora. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$  vs Control.

Posteriormente se evaluó el efecto del silenciamiento de ACSL4 sobre la expresión de StAR. Con este fin se aisló el ARN total de las líneas estables control y siARN ACSL4 y

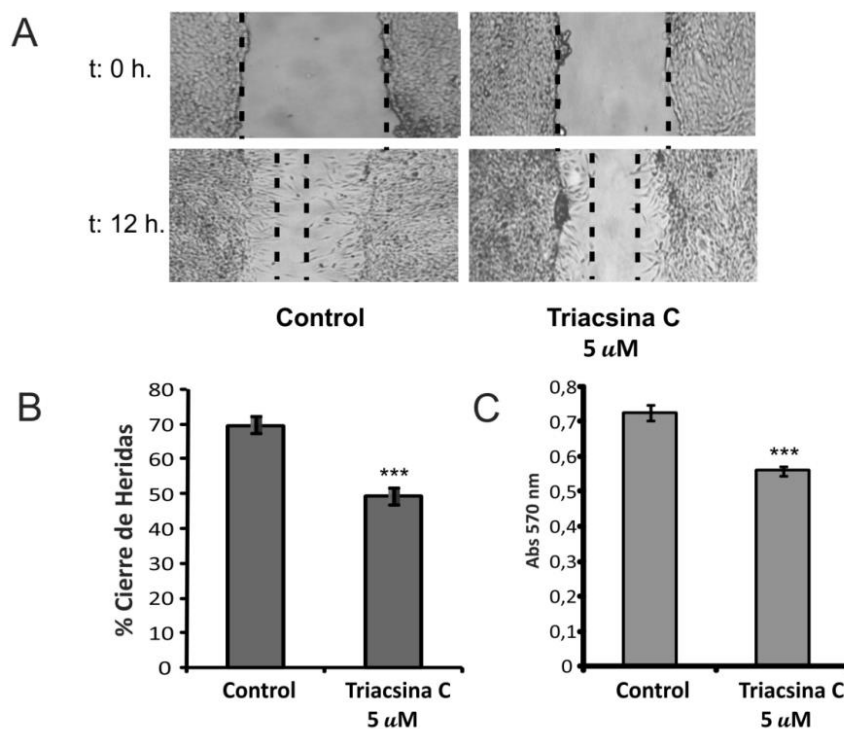
luego se realizó PCR cuantitativa en tiempo real. Se observó que el silenciamiento de ACSL4 produjo una disminución significativa sobre los niveles de expresión de StAR (figura 43).



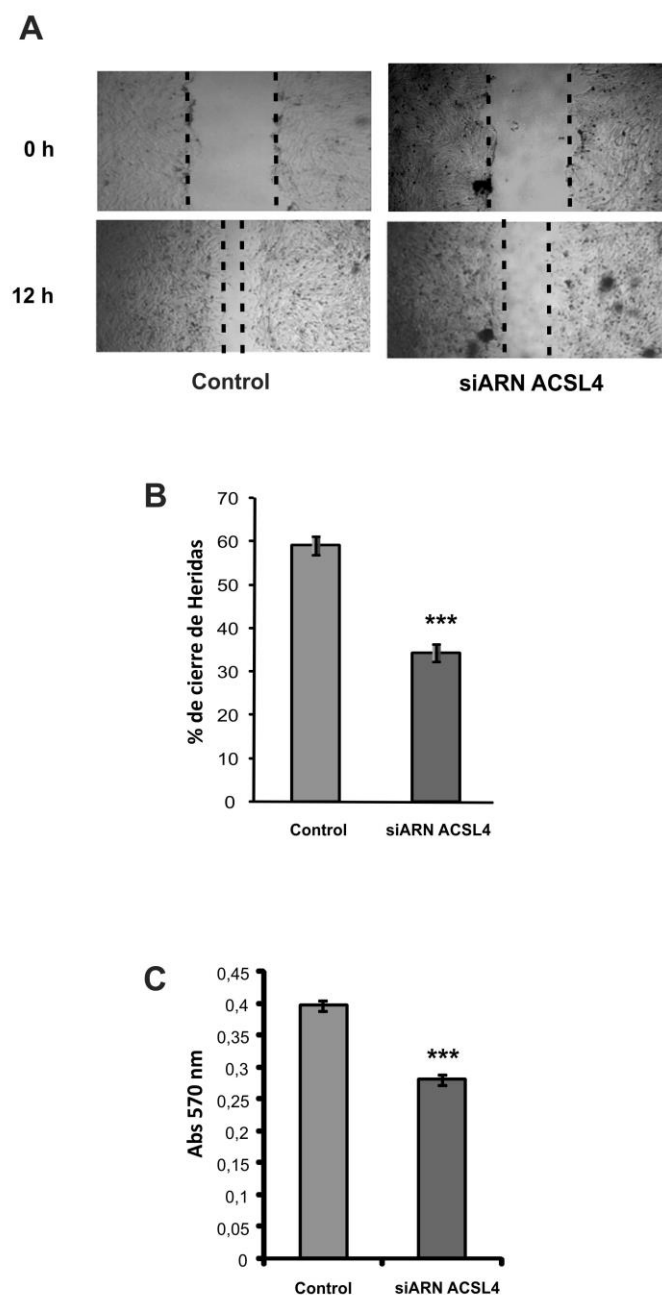
**Figura 43. Efecto del silenciamiento de ACSL4 sobre los niveles de ARNm de StAR.** ARN total de las líneas estables de C6 “Control” y “siARN ACSL4” se utilizó como templado en la reacción de transcripción reversa. Se analizó la expresión de StAR mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó la amplificación de 18S como normalizador. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$  vs Control.

Se analizó también el efecto de la inhibición y del silenciamiento de ACSL4 sobre la migración y proliferación de la línea C6. Se observó que la inhibición de ACSL4 con Triacsina C, produjo tanto la disminución significativa en el porcentaje del cierre de heridas como la disminución en la proliferación celular luego de 48 h de tratamiento (figura 44).

El ensayo de cierre de heridas se realizó también sobre las líneas estables. Observamos que el silenciamiento de la expresión de ACSL4 produjo una disminución del porcentaje de cierre de heridas en comparación con la línea control. El silenciamiento de ACSL4 también disminuyó significativamente la proliferación celular a las 48 h (figura 45).



**Figura 44. Efecto de la inhibición de ACSL4 sobre la migración y proliferación celular en la línea C6.** (A) La evaluación de la migración celular de la línea C6 se realizó mediante el ensayo de cierre de herida. Se realizó una herida en células C6 sembradas en placas de 6 pocillos. Luego se incubaron con o sin Triacsina C 5  $\mu$ M durante 12 h. Las imágenes muestran un ensayo representativo a tiempo 0 h y 12 h. (B) El gráfico muestra el porcentaje de cierre de heridas luego de 12 h de tratamiento. (C) Células de la línea C6 sembradas en placas de 96 pocillos se incubaron con o sin Triacsina C 5  $\mu$ M. Luego de 48 h se determinó la proliferación celular mediante ensayo de MTT. El gráfico muestra la proliferación medida en unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$  vs control.



**Figura 45. Efecto del silenciamiento estable de ACSL4 sobre la migración y proliferación celular en la línea C6.** (A) Evaluación de la migración celular de las líneas C6 estables mediante ensayo de cierre de herida. Se realizaron heridas en cultivos de células estables “siARN ACSL4” y “Control” sembradas en placas de 6 pocillos. Luego de 12 h se determina el cierre de la herida. Las imágenes muestran un ensayo representativo a tiempo 0 h y 12 h. (B) El gráfico muestra el porcentaje de cierre de heridas luego 12 h de tratamiento. (C) También se determinó la proliferación mediante ensayo de MTT. El gráfico muestra la proliferación medida en unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm a 48 h. Los resultados se expresan como la media de unidades arbitrarias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$  vs control.

***Díscusión***

Este trabajo ha revelado aspectos importantes de la estructura del promotor de ACSL4, una enzima cuya expresión promueve la agresión tumoral. El clonado del promotor humano del ACSL4 y su caracterización permitió encontrar por primera vez los factores que contribuyen a la regulación transcripcional diferencial de ACSL4 entre líneas celulares TNBC y las que expresan ER. Los resultados permitieron también identificar factores de transcripción que regularían positiva o negativamente el promotor humano. Estos conocimientos sobre el promotor humano de ACSL4 podrán contribuir, en un futuro, al diseño de nuevos tratamientos destinados a pacientes con tumores que cursan con aumento de la expresión de ACSL4.

Otra conclusión que emerge de este trabajo de tesis plantea que la expresión de ACSL4 es requerida para la síntesis de esteroides en tejido nervioso, como ocurre para la biosíntesis de estas moléculas en tejidos esteroideogénicos clásicos. Aquí demostramos que un estímulo capaz de activar la esteroideogénesis en tejidos esteroideogénicos clásicos, como el AMPc, induce ACSL4 y que esta inducción se requiere para la inducción de StAR y, consecuentemente, para la esteroideogénesis. También demostramos que ACSL4 está implicada en otras funciones como la proliferación y migración celular en astrocitos.

A continuación, discutiremos los resultados logrados en este trabajo.

#### **A. Regulación transcripcional de ACSL4 en líneas de cáncer de mama humano**

En este trabajo procedimos a clonar y caracterizar funcionalmente el promotor de ACSL4, con el objeto de estudiar su regulación transcripcional en células de cáncer de mama. El promotor clonado resultó ser funcional en todas las líneas estudiadas exhibiendo una mayor actividad en las células TNBC. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente en el laboratorio con respecto a la expresión y niveles de ARNm de ACSL4 en dichas líneas celulares [151]. En este trabajo se demuestra por primera vez que la diferencia de expresión de ACSL4 observada en las distintas líneas de cáncer de mama se debe al menos en parte a la regulación transcripcional diferencial del gen.

La caracterización del promotor de ACSL4 incluyó el análisis funcional de distintas zonas del promotor y la identificación de posibles factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional. El análisis *in silico* de la región 5' flanqueante al gen de ACSL4 humano establece la ausencia de caja TATA y una región rica en contenido de GC

compatible con la estructura de promotores TATA-less. Además, se identificaron secuencias consenso para factores de transcripción dentro de la región promotora incluyendo aquellas para ROR $\alpha$ , Sp1, ERR $\alpha$  y para la familia E2F. En cuanto a la funcionalidad de diferentes zonas del promotor, hemos encontrado diferencias y similitudes en los análisis de las deleciones y de las mutaciones sitio dirigidas entre las líneas MDA-MB-231 y MCF-7.

El análisis de las deleciones progresivas 5' mostró que en ambas líneas existe una regulación negativa en el extremo 5' y que la máxima actividad transcripcional la posee un fragmento del promotor que se extiende hasta la posición -218. También se observó que la deleción hasta la posición -31 hace caer la actividad drásticamente en ambas líneas celulares. Estos resultados en conjunto demuestran que los elementos necesarios para la transcripción basal de ACSL4 se encuentran entre las bases -218 y -31. Estos hallazgos concuerdan con resultados obtenidos en nuestro laboratorio para el promotor de ratón [119] y los demostrados para el promotor humano en líneas de cáncer de cérvix [12].

El análisis de deleciones a partir del extremo 3' de la secuencia, indicó que en la zona proximal del promotor existe un elemento activador únicamente en la línea MDA-MB-231. Esta diferencia correlaciona con la expresión diferencial de ACSL4 observada entre las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 [151]. Esta característica no había sido descrita anteriormente sobre el promotor de ACSL4.

Analizando en mayor detalle las similitudes en la funcionalidad del promotor entre ambas líneas podemos destacar que su actividad se incrementa cuando se elimina la secuencia entre las bases -1681 y -873, sugiriendo que la región 5' del promotor contendría al menos un elemento regulador negativo. Coincidentemente, un resultado similar había sido hallado para el promotor de ratón de ACSL4 en nuestro laboratorio (Orlando, Cooke et al. 2013). Dentro de esta zona hemos encontrado un sitio consenso para ROR $\alpha$ , un receptor huérfano relacionado al receptor del ácido retinoico. Este factor forma parte de la familia de receptores nucleares ROR de los cuales existen tres isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), y particularmente existen cuatro variantes para ROR $\alpha$ . En cuanto a su papel en la actividad transcripcional, ROR $\alpha$  modula la estructura de la cromatina para regular positiva o negativamente la transcripción. Actúa mediante el reclutamiento de coactivadores (SRC-1 y 2/GRIP 1/TIF2, proteína de unión C/EBP y PGC-1 $\alpha$ ) o de correpresores (N-CoR, SMRT y RIP140) [408, 409, 424]. El factor de transcripción ROR $\alpha$  en células normales está implicado en la regulación de funciones como metabolismo lipídico, inflamación y ritmo circadiano [425-428]. También se han encontrado diversas acciones de ROR $\alpha$  en distintos tumores como melanoma y cáncer de mama [412, 429, 430]. Incluso, se ha detectado la presencia del



ARNm de ROR $\alpha$  tanto en cánceres de mama que presentan receptor de estrógenos como en los que está ausente [431].

Los experimentos de mutación sitio dirigida que realizamos indican que ROR $\alpha$  actuaría como un regulador negativo sobre el promotor de ACSL4 en líneas de cáncer de mama. Los datos obtenidos muestran una acción inhibitoria de ROR $\alpha$  sobre la transcripción en ambas líneas, en concordancia con lo hallado en el análisis delecional de la zona que contiene al elemento en cis para ROR $\alpha$ . Esta función regulatoria negativa de ROR $\alpha$  sobre el gen de ACSL4 no coincide con lo hallado previamente en músculo esquelético de ratones transgénicos deficientes en ROR $\alpha$ 1 los cuales mostraron una disminución de la expresión de ACSL4 con respecto a los ratones control [427]. La diferencia puede deberse a que esté involucrada una variante diferente de ROR $\alpha$  en la regulación del gen, o bien que el diferente contexto celular determine que actúe como activador o como represor. Se podría inferir por lo tanto que el efecto de ROR $\alpha$  sobre el gen de ACSL4 en el modelo estudiado contribuiría a regular los niveles transcripcionales de ACSL4.

Del análisis de las similitudes observadas entre las líneas celulares surge que la secuencia situada entre las bases -218 y -31 es una zona regulatoria positiva. La deleción de esta secuencia produce una gran pérdida de la actividad en ambas líneas. Esta región es una zona altamente conservada del promotor entre ratón y humano (85% de homología) [119]. Estas evidencias apoyan la idea de que en ese fragmento del promotor se encontrarían los elementos necesarios para la transcripción basal. Resultados similares se han descrito en el trabajo anterior de nuestro laboratorio sobre el promotor de ratón [119] y también lo ha visto Minekura sobre el promotor humano de ACSL4 en células de cáncer de cérvix HeLa 2 [12]. Justamente en esos dos trabajos se han señalado sitios consenso para Sp1 en esta zona altamente conservada. Funcionalmente Sp1 es de particular interés porque participa en la formación de complejos de iniciación de la transcripción. Dado que el promotor de ACSL4 es un promotor que carece de secuencia TATA, pero es funcional en líneas de cáncer de mama podemos relacionar a Sp1 como parte responsable en la formación del complejo de iniciación de la transcripción del gen. El factor Sp1 es un activador de transcripción de unión a CG que se encuentra en muchos promotores. Activa una gran cantidad de genes que codifican proteínas estructurales, metabólicas, enzimas reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y factores de crecimiento [432]. Ya hace muchos años se demostró que las islas CpG a menudo contienen sitios de unión a Sp1. Los promotores de ACSL4 humano y de ratón son ricos en islas CpG y contienen sitios consenso para este factor [12, 119]. El análisis bioinformático realizado en este trabajo de tesis coincide con esos dos trabajos debido a que hemos hallado dos sitios consenso para Sp1 en el fragmento más conservado del promotor (primeras 250 pb). Más aún, mediante

mutación sitio dirigida de un sitio consenso para Sp1 en el promotor de ACSL4 de ratón se demostró que este factor de transcripción actúa como activador [119]. En este trabajo de tesis la mutación sitio dirigida de una secuencia consenso para Sp1 también indicó que funciona como activador en esta región, en coincidencia con lo demostrado para el promotor de ratón [119].

Si bien el factor Sp1 actuaría como activador en MCF-7 y MDA-MB-231, la mutación de este sitio no disminuye completamente la actividad. Debido a que existe otro sitio Sp1 en esta región, el complejo de iniciación podría ser reclutado a través de este elemento cuando el otro sitio Sp1 es mutado. Sin embargo, no pudimos comprobar esta hipótesis debido a la imposibilidad de encontrar una mutación para dicho elemento en cis. Futuros experimentos donde se delecione este sitio para el factor de transcripción Sp1 podrán analizar la relevancia de esta secuencia en la regulación transcripcional del promotor. Podemos concluir que el elemento en cis para Sp1 que se encuentra entre las bases -130 y -110 estimularía la actividad del promotor humano de ACSL4 rico en CpG en células humanas de cáncer de mama de diferente agresividad.

Observamos que la delección hasta la posición -218 genera un incremento diferencial de la actividad entre las dos líneas respecto a la delección anterior (-873 a -605). En la línea MDA-MB-231 este aumento es de 1,8 veces, mientras que en la línea MCF-7 el aumento es de 2,4 veces. Estos resultados sugieren que en el fragmento contenido entre las bases -605 y -218, existiría al menos un elemento regulador de la transcripción que actúa diferencialmente entre las dos líneas celulares estudiadas. El análisis bioinformático de esta zona revela una secuencia consenso para  $ERR\alpha$  dentro de ese fragmento. Estructuralmente  $ERR\alpha$  pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares y comprende el subgrupo NR3B, en el cual se incluyen también  $ERR\beta$  y  $ERR\gamma$ . Estos factores se identificaron en base a su homología con el ER, pero son factores de transcripción huérfanos dado que no se conocen ligandos naturales que modulen su actividad. Análisis cristalográficos indican que  $ERR\alpha$  se mantiene en una conformación activa en ausencia de ligando. Una posibilidad es que estos receptores actúen de manera constitutiva debido a que no existe realmente ningún ligando que los regule [433, 434].

$ERR\alpha$  está involucrado en la regulación transcripcional de genes blanco que participan en diversos procesos. Su expresión es abundante especialmente en órganos con necesidades metabólicas importantes como corazón, músculo esquelético y riñón [414]. Además, se expresa en células madres embrionarias humanas y de ratón [435], durante la diferenciación del adipocito [436] y la morfogénesis del hueso [437, 438] sugiriendo un rol en la diferenciación y el desarrollo.

ERR $\alpha$  es de particular interés ya que está asociado a una mayor agresividad en cáncer de mama. Existe una correlación negativa entre su expresión y la expresión de ER en líneas celulares y muestras de tumores de cáncer de mama agresivos [439]. De hecho, se encuentra sobreexpresado en células TNBC y tiene baja expresión en células que presentan ER [423] siguiendo el mismo patrón de expresión que ACSL4 [148, 149, 151, 178, 179]. ERR $\alpha$  se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama avanzado y está asociado con metástasis de nódulos linfáticos. Se considera un marcador de pronóstico negativo para la enfermedad dado que la expresión de ERR $\alpha$  en carcinoma de mama se asocia con un riesgo incrementado de recurrencia y una progresión clínica adversa [440]. De hecho se conoce que en diferentes líneas de cáncer de mama, ERR $\alpha$  induce la expresión de VGEF [441]. En línea con estos hallazgos, ERR $\alpha$  incrementa la capacidad metastásica por inducción de angiogénesis en tumores de mama [441, 442]. Tanto el silenciamiento como la inhibición con el compuesto XCT-790, un inhibidor selectivo de ERR $\alpha$ , inhibieron la EMT de células TNBC. Además en tumores xenográficos de células MDA-MB-231, la inhibición de ERR $\alpha$  produce una disminución del crecimiento tumoral y metástasis, inhibiendo la expresión de fibronectina y Vim e incrementando la expresión de E-caherina [423]. A su vez, el silenciamiento de ERR $\alpha$  en las MDA-MB-231 [423, 441] y su inhibición por XCT-790 [423, 443] reducen la migración celular *in vitro*. Por otra parte, la sobreexpresión de ERR $\alpha$  incrementa la invasión y migración de células TNBC (Wu, Chen et al. 2015). A su vez XCT-790 disminuye la proporción de células en fase G2/M e induce apoptosis en células TNBC [422]. Todos estos trabajos asocian a ERR $\alpha$  con un pronóstico negativo del cáncer de mama.

Para ejercer su acción el factor de transcripción ERR $\alpha$  requiere una interacción específica con proteínas coregulatorias. Entre los coactivadores más estudiados se encuentran PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$ , SRC-2, y AIB1 [444, 445]. Cuando se forma un complejo de ERR $\alpha$  con el coactivador se produce una inducción de la transcripción de sus genes blanco denominada transactivación. Dentro de los coactivadores se destaca PGC-1 $\alpha$  que es un coactivador de receptores nucleares promiscuo clave en el metabolismo energético. Entre los correpresores de ERR $\alpha$  encontramos a RIP140 y DPF2. El mecanismo de acción de estos correpresores se basa en suprimir la transactivación de ERR $\alpha$ , regulando la transcripción [446, 447].

Los experimentos de mutación sitio-dirigida indicaron que ERR $\alpha$  actúa como activador solo en las células MDA-MB-231. Estos resultados son coincidentes con lo que observamos cuando se deleta el fragmento que contiene el sitio consenso para ese factor de transcripción. Mas aún, están en línea con los trabajos que describen la relación de la expresión y función de ERR $\alpha$  en TNBC. Nuestros resultados sugieren que este factor de

transcripción que se sobreexpresa en MDA-MB-231 actuaría como activador de ACSL4 en esta línea celular aportando de esta manera al fenotipo agresivo que la caracteriza. Por lo tanto, ERR $\alpha$  mediante una regulación positiva de la expresión de ACSL4 contribuiría a la agresividad de células TNBC. En MCF-7, donde se conoce que ERR $\alpha$  tiene menor expresión [423], la mutación sitio dirigida no resultó en cambios significativos en la actividad del promotor con respecto a la construcción salvaje. Este hecho demuestra que, en esta línea de baja agresividad, en la cual existe expresión de ER, ERR $\alpha$  no tendría implicancia en la regulación de ACSL4. Aún más, la mutación del sitio consenso para ERR $\alpha$  hace caer la actividad del promotor de ACSL4 en MDA-MB-231 a niveles similares a los que tiene la línea MCF-7, determinando que este factor de transcripción tiene una importancia fundamental en la expresión diferencial de ACSL4 entre líneas. También es interesante observar que un trabajo reciente señala que la línea MDA-MB-231 posee una alta expresión de ARNm de PGC-1 $\alpha$  mientras que MCF-7 tiene baja expresión del mismo [448]. Esta sobreexpresión simultánea del coactivador PGC-1 $\alpha$  y de ERR $\alpha$  en MDA-MB-231 apoya la hipótesis de que ERR $\alpha$  pueda activar la transcripción en células en MDA-MB-231.

El rol de ERR $\alpha$  en la regulación del promotor de ACSL4 en la línea MDA-MB-231 se confirmó cuando, mediante el ensayo de CHIP, demostramos su unión al promotor. Más aún, hemos evaluado la función de ERR $\alpha$  sobre la expresión de ACSL4 mediante la utilización del agonista inverso específico XCT-790. Se observó que tanto la actividad del promotor como la expresión de ACSL4 disminuyen significativamente al inhibir dicho factor de transcripción. Todo esto demuestra por primera vez que ERR $\alpha$  es un factor de transcripción implicado en la sobreexpresión de ACSL4 en líneas TNBC promoviendo de esta manera una mayor agresividad en las mismas.

Estudios anteriores propusieron a ERR $\alpha$  como un posible blanco terapéutico en cáncer de mama y actualmente se está estudiando si su inhibición podría ser una nueva estrategia para el tratamiento de los TNBC [422, 423]. En este trabajo hemos observado que la utilización conjunta de inhibidores de ACSL4 y ERR $\alpha$  disminuye la proliferación en células MDA-MB-231, observando un efecto sinérgico al utilizar ambos inhibidores en dosis que individualmente no tienen efecto. Futuros estudios que incluyan la combinación de inhibidores de estas proteínas sobre el crecimiento tumoral podrían llevar a diseñar una nueva combinación de drogas para una mayor efectividad en el tratamiento de cáncer de mama altamente agresivo.

Entre los factores de transcripción evaluados dentro del promotor humano de ACSL4, queda por describir el posible rol de factores de la familia E2F. A través del análisis *in silico* hemos encontrado 10 sitios consenso para miembros de esta familia. Los factores de

transcripción E2F tienen funciones en el control del ciclo celular [449, 450]. La familia E2F tiene 9 miembros que se dividen en dos subgrupos que actúan de manera antagónica: los activadores (E2F1, 2 y 3a) y los represores (E2F3b, 4-8). Los miembros del subgrupo activador son factores cuya localización es nuclear e interactúan específicamente con el supresor de tumores Rb. Estos factores son liberados del complejo Rb-E2F cuando Rb es hiperfosforilado y, de esta manera, pueden activar a su gen blanco. Así mismo, se sabe que la sobreexpresión de cualquiera de los factores E2F activadores induce la entrada al ciclo celular proliferativo, mientras que su pérdida genera una disminución total de la proliferación celular [451]. El hecho de que cada subgrupo posea más de un factor demuestra que también hay redundancia dentro de estos factores de transcripción. Dada la variedad de actividad en los miembros de la familia se sugiere que el efecto neto de la actividad de los E2Fs sobre la proliferación celular depende del equilibrio e interacción entre la activación y la represión de los miembros de la familia E2F. Los mismos miembros de la familia E2F pueden regular la expresión de otros miembros de la familia, formando circuitos de retroalimentación complejos para garantizar un nivel equilibrado de activadores y represores en cada fase del ciclo celular. Sin embargo, no siempre estos factores se comportan de la manera clásica en la cual fueron clasificados determinando que pueden tener una función dual. Por ejemplo, los hallazgos presentados por Chong y colaboradores en los cuales los activadores canónicos E2F1-3 en células progenitoras pueden reprogramarse a represores en células diferenciadas, exponen funciones duales para E2F1-3 en la transcripción *in vivo* [452].

Actualmente se sabe que, en la gran mayoría de los cánceres humanos, la actividad de los factores E2F se encuentra desregulada a través de diferentes mecanismos, y que en general la vía Rb/E2F es uno de los principales blancos. Todas las proteínas E2F muestran un alto grado de identidad en su dominio de unión al ADN, lo cual se demostró mediante estudios *in vitro*, que revelaron que todos los factores pueden unirse a la secuencia consenso 5'-TTTNNCGC-3'. La afinidad de unión de cada miembro de la familia a la secuencia mencionada está determinada por la naturaleza de las seis bases centrales que conforman el motivo de unión, por el tipo celular, y por la fase del ciclo en la que se encuentre la célula [453]. Dicha unión también se ve afectada por la metilación del dinucleótido CpG en la secuencia consenso, interfiriendo con la unión de algunos miembros de la familia E2F, convirtiéndose esa región en un blanco de silenciamiento epigenético [453, 454]. En conjunto, estos aspectos contribuyen a explicar la amplia gama de genes blanco de la familia E2F y cómo es que en distintos momentos celulares los miembros de una misma familia pueden activar blancos incluso antagónicos.

El sitio consenso más proximal que hallamos para la familia E2F (E2F.c) en el promotor de ACSL4 se localiza en una zona del promotor que muestra diferencias funcionales entre las líneas MDA-MB-231 y MCF-7. En el análisis de las deleciones del extremo 3' se determinó que dentro de los 43 pares de bases proximales del promotor existiría un elemento regulador positivo de la transcripción únicamente en la línea MDA-MB-231. El análisis de la mutación sitio dirigida de ese sitio consenso sugiere que actúa como activador en ambas líneas, por lo cual el resultado no coincide con la actividad diferencial de esta región sugiriendo que este factor no sería el responsable de esa diferencia. Creemos entonces que deben existir mecanismos adicionales que no hemos detectado aún como otros factores de transcripción implicados o la preferencia de TSS alternativos en MDA-MB-231 en esta zona del promotor. Los genes que exhiben diferentes TSS poseen la característica de carecer de secuencias consenso TATA y este es el caso de ACSL4 [12, 119]. Estudios bioinformáticos revelan que la mayoría de los genes de mamíferos no responden al modelo simple en el cual la secuencia TATA dirige la transcripción desde una única posición nucleotídica definida. Muchos genes localizan sus TSS extendiéndose entre 50-100 bp. Los promotores con CpG atraerían ARN Pol II y su actividad es modulada por otros factores de transcripción [120, 455]. Es probable que la actividad de ARN Pol II en estas 43 pb del extremo 3' del promotor tenga una regulación diferente en las distintas líneas en estudio en base a los factores activos en cada una de ellas. Para corroborar la hipótesis de la preferencia de TSS en MDA-MB-231, futuros estudios adicionales podrían llevarse a cabo como un estudio de amplificación rápida de los extremos 5' de transcritos (5' RACE) que nos permitiría identificar cuál es el TSS principal en el modelo de estudio. Otra posibilidad es que en esta zona del promotor existan mecanismos epigenéticos que actúen en forma diferencial entre las líneas. Análisis bioinformáticos revelan que el estado de metilación del promotor de ACSL4 es menor en muestras de tumores de pacientes de cáncer de mama que en tejido mamario normal, sugiriendo una actividad del promotor más alta en tumores que en el tejido normal. Esto demuestra que la metilación podría estar implicada en la regulación del promotor de ACSL4.

Existen dos secuencias consenso adicionales para la familia E2F que se encuentran entre las bases -14 y +80 del promotor, donde se había observado que la deleción de este fragmento produce mayor caída de la actividad en MCF-7 con respecto a MDA-MB-231. Las mutaciones sitio dirigidas de dichos elementos en cis revelan que el sitio denominado en este trabajo E2F.b actuaría como represor en ambas líneas y el denominado E2F.a actuaría como activador en las MDA-MB-231 y como represor en las MCF-7. Esta última diferencia podría deberse a que en general, varios miembros de la familia E2F se unen a una región de un promotor y que la especificidad en la unión de un factor en particular puede depender de la cantidad presente de cada miembro de la familia en el núcleo [453]. Finalmente

concluimos que en esta zona del promotor ambos elementos actuarían como represores en las células MCF-7 mientras que en las MDA-MB-231 uno actuaría como represor y el más distal como activador. Estos resultados en conjunto no corresponden con la diferencia de caída de actividad observada al delecionar este fragmento. Seguramente la regulación del promotor debida a los sitios E2F pueda deberse a la acción conjunta de todos ellos y al balance del contenido de cada línea de activadores/represores y no se deba a uno solo en particular.

Es interesante destacar que hemos demostrado que las 43 pares de bases del extremo 3' serían relevantes en el aumento de la actividad del promotor en la línea MDA-MB-231. La delección de estas bases genera una caída que lleva la actividad del promotor a los mismos niveles que las MCF-7, línea en la cual la expresión de ACSL4 es baja. Esto se comprobó tanto en la construcción pNL1.1 -1681;+80 que contenía el extremo 5' intacto como también en pNL1.1 -873;+80 en la cual ese extremo había sido delecionado. Tanto pNL1.1 -1681;+80 como pNL1.1 -873;+80 contienen el sitio consenso para  $ERR\alpha$ , sin embargo, la actividad de estas construcciones que poseen la delección de los 43 bp del extremo 3' no mostró diferencias significativas entre las líneas celulares. En base a estas últimas observaciones parecería que  $ERR\alpha$  para ejercer su efecto estimulador en las MDA-MB-231 necesita del extremo 3' intacto. A su vez también es muy interesante observar que el promotor, necesita de la unión de  $ERR\alpha$  para mantener la diferencia entre líneas celulares, dado que la construcción mutante para  $ERR\alpha$  que contiene a las 43 pb del extremo 3', hace caer la actividad del promotor a niveles similares a los observados en MCF-7. Todo esto demuestra que es necesario el extremo 3' y la acción de  $ERR\alpha$  para producir la regulación diferencial entre las líneas celulares.

Todos estos resultados en conjunto establecen por primera vez que existen similitudes y diferencias en la regulación transcripcional de ACSL4 en distintas líneas de cáncer de mama. Se destaca que las secuencias consenso para  $ROR\alpha$ , Sp1 y E2F están involucradas en la regulación de la actividad del promotor humano de ACSL4 en ambas líneas de cáncer de mama estudiadas, y que  $ERR\alpha$  actúa regulando positivamente la transcripción y la expresión de ACSL4 sólo en MDA-MB-231 correlacionando con la diferencia de expresión de ACSL4 entre líneas.

Reportes previos indican que existe una relación inversa entre la expresión de ACSL4 en cáncer de mama y la expresión de ER. Se demostró que la expresión de ACSL4 correlaciona inversamente con la expresión del ER en líneas celulares de cáncer de mama y en muestras de tumores de pacientes [149, 151, 178, 179]. En nuestro laboratorio se ha observado *in vitro* que la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 Tet-Off/ACSL4

modula negativamente la expresión de ER tanto a nivel ARNm como de proteína y esta respuesta se revierte mediante el tratamiento con doxiciclina que reprime la expresión de ACSL4, verificando que efectivamente ACSL4 es responsable de la regulación negativa de ER [149]. Aún más, el silenciamiento de ACSL4 en la línea MDA-MB-231 reestablece la expresión de ER [148]. Los resultados determinados *in vitro* se verificaron también en modelos *in vivo*. Al inocular células de la línea estable MCF-7 Tet-Off/ACSL4 en un modelo xenográfico de ratones nude atímicos hembras se desarrollaron tumores con marcado polimorfismo nuclear, alto índice mitótico y baja expresión de ER y PR tanto a nivel ARNm como de proteína [149]. Resultados similares a este fueron observados por otros autores en células MCF-7 con sobreexpresión de ACSL4. Adicionalmente, se ha visto que la sobreexpresión de ACSL4 disminuye la sensibilidad a los estrógenos [179]. Todos estos antecedentes indican que ACSL4 modula negativamente la expresión de ER y disminuye la sensibilidad a los estrógenos.

La regulación de ACSL4 por ER parece ser recíproca, ya que el silenciamiento de ER induce la expresión de ACSL4, de acuerdo a los resultados de un microarray donde se silenció ER en células MCF-7. Esto indicaría que ER podría modular la expresión de ACSL4 [179]. En base a esa observación, en este trabajo de tesis nos propusimos evaluar la regulación de ACSL4 por ER mediante la restauración de la expresión de ER en líneas TNBC. Los resultados obtenidos correspondieron con las observaciones de Wu y colaboradores, ya que al restaurar la expresión de ER en líneas TNBC la actividad del promotor, los niveles de ARNm y la expresión de ACSL4 disminuyeron. Estos resultados infieren que ER regularía negativamente la expresión de ACSL4. Sin embargo, en el análisis bioinformático de los elementos en cis del promotor de ACSL4 humano, no se han hallado secuencias consenso para ER. La ausencia de secuencias consenso para ER sugiere que este factor de transcripción no se uniría directamente al promotor de ACSL4. Por lo tanto, los efectos observados podrían deberse a mecanismos indirectos de regulación. Por ejemplo, existen reportes en los cuales se demostró la interacción entre Sp1 y ER por lo cual este podría ser un potencial mecanismo involucrado [456]. Mayores estudios serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

## **B. Regulación y función de ACSL4 en células neuroesteroidogénicas**

El cerebro es un órgano neuroesteroidogénico en el cual las neuronas, los astrocitos y oligodendrocitos expresan enzimas que participan la neuroesteroidogénesis [41]. La neuroesteroidogénesis es el proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis de hormonas



esteroides en el SN. Los neuroesteroides participan en procesos fisiológicos como patológicos. Existen patologías del SN que cursan con alteraciones en la neuroesteroidogénesis [41]. A su vez, frente a ciertas injurias se induce la neuroesteroidogénesis con fines neuroprotectores [326]. Por tales motivos, el estudio de factores que estén involucrados en la regulación de la neuroesteroidogénesis es de importancia tanto para el entendimiento de la fisiología de la biosíntesis de esteroides como de situaciones patológicas del SN donde dicho mecanismo se encuentre alterado. En nuestro laboratorio se ha estudiado extensamente el rol de ACSL4 en la esteroidogénesis en tejidos esteroidogénicos clásicos [15, 84, 86, 109]. Por otro lado, se ha descrito la expresión de la enzima ACSL4 en cerebro [16, 21, 383]. Aunque se ha estudiado el rol de ACSL4 en neuronas y en el desarrollo del sistema nervioso [16, 385-387], nada se había descrito acerca de su rol en la neuroesteroidogénesis y su regulación en células de la glía.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que ACSL4 se expresa y es regulada por AMPc tanto a nivel de proteína como de ARNm en astrocitos de cerebro total de ratas neonatas. Estos resultados concuerdan con lo observado en un trabajo reciente que demostró que la estimulación con dibutilil-AMPc incrementa la captación y esterificación del AA en astrocitos de ratón y sugiere que este aumento se debe a la inducción de la expresión de ACSL4 y ACSL3 frente a ese estímulo [21]. Este mismo efecto del AMPc sobre la expresión de ACSL4 se ha visto sobre tejidos esteroidogénicos clásicos en trabajos previos del laboratorio [15, 85, 86, 102, 109, 119].

Como se ha mencionado, StAR es una proteína con un papel clave en la neuroesteroidogénesis y se expresa en cerebro. Está demostrado que la neuroesteroidogénesis se lleva a cabo en células de la glía [290, 297, 457]. En células gliales en cultivo y en la línea C6 el AMPc induce la síntesis *de novo* de StAR. En concordancia, StAR co-localiza con el complejo P450scc en cerebro adulto humano y de ratón. El AMPc aumenta la actividad del promotor de StAR, la localización de StAR en la mitocondria y la producción de P5 [283, 297, 300]. Todo esto demuestra que el mecanismo utilizado por el cerebro para regular el paso limitante de la neuroesteroidogénesis involucra la participación de StAR. Sin embargo, no se sabía hasta el momento si ACSL4 regula la expresión de StAR en células de la glía y por ende se desconocía su rol en la regulación de la neuroesteroidogénesis.

Se ha observado tanto en neuronas, astrocitos y en la línea de astroglioma C6 un incremento de la actividad transcripcional, la expresión y los niveles de ARNm de StAR mediante la estimulación con AMPc o forskolina [283, 297]. Además, se demostró que la activación de PKA lleva a la fosforilación y activación de TSPO y StAR en astrocitos

hipotalámicos de ratas hembra adultas. Aún más, la inhibición de PKA deja sin efecto tanto la activación de TSPO como de StAR [370]. Por lo tanto, dado que ACSL4 está involucrada en la vía de activación de StAR en tejidos esteroideogénicos clásicos [15, 18, 85, 86, 109, 116], quisimos determinar si ACSL4 también regula a StAR mediante una vía dependiente de AMPc en astrocitos de rata neonatas.

En este trabajo de tesis se ha demostrado que la inhibición de ACSL4 disminuye los niveles de ARNm de StAR inducidos por 8Br-AMPc en astrocitos, por lo que se infiere que la regulación por AMPc de los niveles de StAR, ya reportada en astrocitos [283, 297, 370], está mediada -al menos en parte- por la expresión de ACSL4. El efecto de ACSL4 sobre la expresión del ARNm de StAR también se verificó mediante el silenciamiento estable de ACSL4 en la línea C6. El knockdown de ACSL4 en la línea C6 genera un descenso de la expresión del ARNm de StAR. Estos resultados demuestran la regulación de la expresión de StAR por ACSL4 en otro modelo neuroesteroideogénico.

La consecuencia del aumento de la expresión de StAR en astrocitos de rata es el incremento de la neuroesteroideogénesis [283, 297, 370]. Está reportado que en cultivo de astrocitos de hipotálamo de ratas post-púberes hembra el E<sub>2</sub> induce la síntesis de P4 por un mecanismo dependiente de AMPc [370]. En astrocitos de mescencéfalo embrionario y cerebelo la estimulación con AMPc incrementa la producción de P5 [297]. En este trabajo hemos demostrado que la inducción de la neuroesteroideogénesis por 8Br-AMPc está mediada, al menos parcialmente, por ACSL4. La disminución de la inducción de la neuroesteroideogénesis por 8Br-AMPc al inhibir ACSL4 confirma que esta enzima participa en el proceso neuroesteroideogénico en astrocitos.

Los efectos de ACSL4 sobre la neuroesteroideogénesis en astrocitos y la expresión de StAR en células de la glía van en línea con los estudiados previamente en el laboratorio en tejidos esteroideogénicos clásicos [15, 18, 85, 86, 109, 116].

Se ha descrito que los astrocitos y células C6 incorporan AA y lo metabolizan a PGs y LTs [458]. Incluso se ha planteado que la captación y la metabolización de AA por células gliales podría jugar un papel importante *in vivo*, por ejemplo, en la isquemia cerebral. Huang y col. han demostrado que el metabolismo del AA está involucrado en la migración de astrocitos de cerebro de ratas. Ese grupo demostró que el factor TGF- $\beta$ 1 induce la migración de astrocitos mediante la activación e inducción de la expresión de 5-LOX [405]. En líneas de cáncer de mama existe una correlación directa entre la expresión de ACSL4 y de 5-LOX y ambas enzimas interactúan funcionalmente en la regulación de la migración celular [151]. Además, una comparación entre líneas celulares de cáncer de mama con distinta expresión

de ACSL4 reveló un contenido mayor de metabolitos de la 5-LOX en las líneas con mayor expresión de ACSL4 [151]. Aún más, el silenciamiento de ACSL4 en líneas de cáncer de mama TNBC generó una disminución en la producción de metabolitos de la 5-LOX que correlacionaron con una disminución en la migración celular [151]. Estos antecedentes promovieron nuestro interés en conocer si en nuestro modelo neuroesteroideogénico la expresión de ACSL4 se vincula con la migración celular. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron que la inhibición de ACSL4 con Triacsina C reduce la migración de los astrocitos. Estos resultados son consistentes con lo observado por Huang y colaboradores dado que se conoce que la disminución de ACSL4 correlaciona con una disminución en la expresión de la 5-LOX y de la producción de sus metabolitos [405]. A su vez la disminución en la migración observada al inhibir ACSL4 en astrocitos va en línea en relación a la expresión de ACSL4 y la migración demostrada previamente en líneas de cáncer de mama [151]. A partir de nuestros hallazgos, y en línea con los antecedentes, se demuestra por primera vez que ACSL4 participa en la regulación de la migración de astrocitos de ratas neonatas.

En cultivo primario de astrocitos, después de una lesión, se induce 5-LOX con el concomitante aumento de la producción de LTs como el CysLT. Este metabolito activa el receptor CysLT1R resultando en la proliferación de astrocitos [459, 460]. La inhibición del receptor CysLT1R disminuye la proliferación de astrocitos inducida por una lesión isquémica o bajas concentraciones de LTD4, demostrando que los LTs estarían implicados en la regulación de la proliferación de astrocitos [460]. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que, en líneas de cáncer de mama, ACSL4 y 5-LOX interactúan funcionalmente en la regulación de la proliferación celular. La disminución de los metabolitos de la 5-LOX observada mediante el silenciamiento de ACSL4 en líneas de cáncer de mama TNBC, correlacionó con una disminución en la proliferación celular, que también se ha visto al inhibir específicamente la expresión de ACSL4 en la línea MCF-7 Tet-Off/ACSL4 [151]. Además, la expresión de ACSL4 aumenta la proliferación celular en líneas de cáncer de mama [151]. Nuestros resultados muestran que la inhibición de ACSL4 por Triacsina C disminuye la proliferación de astrocitos. Estos resultados concuerdan a lo observado en las líneas de cáncer de mama y sugieren que podría estar involucrada en estas células también en la regulación de la producción de LTs al igual que en otros modelos. Por otra parte, el hecho que en células de la línea de astroglioma C6, que expresan mayores niveles de ACSL4 que los astrocitos normales, el silenciamiento estable de esa enzima reduzca la migración y proliferación celular constituye una sólida evidencia de la participación de ACSL4 en ambos procesos.

En síntesis, concluimos que ACSL4 exhibe una expresión dependiente de AMPc y que participa en la regulación de la expresión de StAR y en la producción de hormonas esteroideas mediada por ese estímulo en astrocitos de rata en cultivo. Además, en ese sistema ACSL4 participa también en la migración y proliferación de células neuroesteroideogénicas. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento básico de la funcionalidad de ACSL4 en el sistema nervioso central.

*Conclusiones*

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue caracterizar los mecanismos de regulación de ACSL4 en distintos modelos y profundizar los estudios sobre su función e implicancia en procesos fisiológicos y patológicos. Se conocía en detalle la regulación hormonal de la expresión de ACSL4 en tejidos esteroideogénicos [15, 86, 102, 109], pero no se había caracterizado hasta el momento la regulación transcripcional de esta enzima en patologías humanas. Se ha descrito en este laboratorio que ACSL4 tiene un rol causal en la agresividad de líneas de cáncer de mama TNBC [148, 149, 151]. Otros autores han encontrado una correlación de la expresión de ACSL4 y la agresividad en tumores de pacientes [178]. En base a lo anterior se planteó la hipótesis que, en líneas humanas de cáncer de mama de diferente agresividad, la activación de distintos mecanismos de regulación transcripcional podría establecer un perfil de expresión particular para esta enzima.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron que existen diferencias en la regulación transcripcional de ACSL4 en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad. Las observaciones que avalan estas diferencias son las siguientes:

- La secuencia de 1,8 kb del promotor de ACSL4 tiene mayor actividad en las líneas TNBC.
- Se encontró la secuencia consenso para ERR $\alpha$  entre las posiciones -317 y -293. Este factor de transcripción actúa como activador del promotor de ACSL4 solamente en la línea MDA-MB-231, mientras que en la línea MCF-7 de menor agresividad no afecta su regulación transcripcional. Este factor de transcripción sería de una gran importancia para la actividad diferencial entre líneas observada.
- Se determinó que la zona proximal del promotor, específicamente el fragmento del extremo 3' comprendido entre las posiciones +123 a +80, activa la transcripción del promotor sólo en MDA-MB-231. Se observó que esta zona proximal del promotor es esencial para el efecto de ERR $\alpha$  en líneas de alta agresividad.

Otros resultados de este trabajo de tesis evidencian que también existen similitudes en la regulación transcripcional de ACSL4 entre líneas. Las observaciones que avalan estas similitudes son las siguientes:

- Entre las posiciones -1681 y -873 existiría un elemento represor. El análisis bioinformático halló una secuencia consenso para ROR $\alpha$ . La mutación sitio dirigida de dicha secuencia determinó que este factor de transcripción actuaría como represor del promotor de ACSL4.

- La zona con mayor actividad del promotor comprende el fragmento entre las posiciones -31 y -218. Existen secuencias consenso para Sp1 dentro de este fragmento y los experimentos de mutación sitio dirigida indicaron que este factor de transcripción actuaría como activador en líneas de diferente agresividad.

Mediante análisis bioinformático se determinó que existen tres secuencias consenso para la familia de factores de transcripción E2F en el extremo 3' del promotor de ACSL4. Se encontraron diferencias y similitudes en la actividad de dichos sitios consenso sobre el promotor de ACSL4 en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad. Las observaciones que avalan esta afirmación son las siguientes:

- Experimentos de mutación sitio dirigida indicaron que la secuencia consenso para la familia E2F comprendida entre las posiciones +97 y +113 actuaría como activador en líneas de diferente agresividad.

- Por otra parte, el elemento para la familia E2F ubicado entre las posiciones +52 y +69 actuaría como represor en las líneas de cáncer de mama estudiadas.

- Por otro lado, el sitio consenso para la familia E2F ubicado entre las posiciones +14 y +35 actuaría como activador en las MDA-MB-231 y como represor en las MCF-7, indicando que este sitio se comporta de forma diferencial entre líneas.

Estos resultados permiten sugerir que el balance de la relación E2F activadores/E2F represores que posea cada línea celular y la contribución de ellos en conjunto a la actividad del promotor determina su efecto sobre la expresión de ACSL4 en diferentes líneas de cáncer de mama. Una investigación más profunda será necesaria para determinar el rol que puedan ejercer los diferentes miembros de la familia E2F sobre la regulación transcripcional de ACSL4.

Se demostró que ERR $\alpha$  está implicado en la inducción de la transcripción de ACSL4 en la línea MDA-MB-231. Esta conclusión está avalada por los siguientes resultados:

- Experimentos de ChIP demostraron que el factor de transcripción ERR $\alpha$  se une físicamente al promotor de ACSL4 en la línea MDA-MB-231.

- La inhibición de la actividad de  $ERR\alpha$  produce una disminución tanto en la actividad del promotor como en la expresión de ACSL4 en la línea MDA-MB-231.
- La combinación de inhibidores de ACSL4 y  $ERR\alpha$  redujo en forma significativa la proliferación de células MDA-MB-231 *in vitro*. Estos inhibidores fueron utilizados en dosis sub-máximas. La combinación de estos tuvo un efecto sinérgico sobre la proliferación de estas células, dado que el tratamiento con estas drogas en forma individual prácticamente no inhibió la proliferación celular. Esto apoya la conclusión de que existe una vinculación entre  $ERR\alpha$  y ACSL4.

También se ha estudiado la regulación de ACSL4 por ER. Los resultados permiten concluir que ER regula negativamente la expresión de ACSL4. Esta conclusión está avalada por los siguientes resultados:

- La restauración de la expresión de ER en líneas TNBC, disminuye la actividad del promotor, los niveles de ARNm y la expresión de ACSL4. Estos resultados indican que ER podría estar implicado en el control de la expresión de ACSL4. La forma mediante la cual ejercería esta regulación sería a través de un mecanismo indirecto dado que no se ha hallado en el análisis bioinformático secuencias consenso de ER en el promotor de ACSL4.

Los resultados obtenidos permiten concluir que  $ERR\alpha$  y ER están implicados en la regulación diferencial de la expresión de ACSL4 entre líneas de cáncer de mama triple negativas y líneas ER+. ACSL4 y  $ERR\alpha$  podrían ser estudiados en un futuro como nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama altamente agresivo y el avance en el conocimiento en este campo podría ser promisorio, ya que hoy en día esta patología no presenta un tratamiento efectivo.

Se estudió la regulación y funcionalidad de ACSL4 en células neuroesteroidogénicas. Si bien la expresión de ACSL4 se había descrito en el SN [16, 21, 383], poco se conocía sobre su regulación y función en células de la glía. Dado que en tejidos esteroideogénicos clásicos ACSL4 está implicada en la esteroideogénesis [15, 84-86, 102, 109], se planteó la hipótesis de que existiría en astrocitos una regulación de la expresión de ACSL4 y que esta enzima podría estar involucrada en algunas funciones tales como la neuroesteroidogénesis.

Por lo tanto, como último objetivo específico de este trabajo de tesis se planteó analizar la regulación de la expresión de ACSL4 en astrocitos y evaluar su rol funcional en este tipo celular, en diferentes procesos tales como, la migración, proliferación y producción de neuroesteroides.



Los resultados de este trabajo de tesis demostraron que ACSL4 está involucrada en la neuroesteroidogénesis inducida por AMPc en astrocitos de rata. Esta conclusión está avalada por los siguientes resultados:

- Se demostró la expresión de ACSL4 en cultivo primario de astrocitos de cerebro total de ratas neonatas y se observó que el tratamiento con AMPc aumentó tanto su expresión como los niveles de ARNm.
- La expresión de ACSL4 se determinó también en la línea de glioma de rata C6, siendo en este modelo significativamente mayor que en los astrocitos de rata.
- La neuroesteroidogénesis en astrocitos de rata evaluada a través de la producción de P4 se estimuló mediante el tratamiento con AMPc. Este aumento se inhibió cuando los astrocitos se trataron previamente con el inhibidor de ACSL4, Triacsina C.
- En este mismo modelo los niveles de ARNm de StAR aumentaron mediante el tratamiento con AMPc. Este aumento se inhibió cuando los astrocitos se trataron previamente con el inhibidor de ACSL4, Triacsina C.
- Se evidenció una disminución en los niveles de ARNm de StAR mediante el silenciamiento estable de ACSL4 en la línea de glioma de rata C6.

En este trabajo de tesis se demostró que ACSL4 está involucrada en la migración y proliferación de astrocitos. Esta conclusión está avalada por los siguientes resultados:

- Tanto la migración como la proliferación de astrocitos primarios de rata y de la línea de glioma C6 se inhibió mediante el tratamiento con el inhibidor de ACSL4, Triacsina C.
- El silenciamiento estable de ACSL4 en la línea de glioma de rata C6 produjo una disminución tanto en la migración como en la proliferación celular.

Por lo tanto, en esta segunda parte del trabajo de tesis se demostró un incremento de la expresión de ACSL4 por un mecanismo dependiente de AMPc. Como ocurre en sistemas esteroideogénicos clásicos, comprobamos que esta enzima está implicada en la regulación de la expresión de StAR y en la producción de hormonas esteroideas mediada por AMPc. Por otro lado, se demostró que ACSL4 participa también en la migración y proliferación de células neuroesteroidogénicas.

En síntesis, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan conocimientos sobre la regulación y función de ACSL4. Los estudios realizados en el modelo

neuroesteroidogénico amplían los conocimientos del rol de esta enzima en la esteroidogénesis y en las funciones que cumple en células de la glía. Los resultados obtenidos en el modelo de cáncer de mama aportan conocimientos que sustentan las bases para abordar, en un futuro, el estudio de ACSL4 y  $ERR\alpha$  como nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos en la terapia del cáncer de mama altamente agresivo.

*Resumen*

Los niveles intracelulares de ácido araquidónico (AA) son regulados en respuesta a diferentes agonistas en distintos tejidos. El AA es el precursor común de una familia de lípidos con un papel clave en la fisiología y fisiopatología. La actividad biológica de los eicosanoides explica la existencia, en los distintos tipos celulares, de mecanismos apropiados para controlar rigurosamente los niveles de AA libre.

Las enzimas ACSL, (Acil-CoA sintetasa de cadena larga), catalizan la síntesis de acil-CoA de ácidos grasos de cadena larga. Un miembro de esta familia es la enzima Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4), enzima que tiene preferencia por los ácidos grasos poliinsaturados, en particular por el AA, y un rol importante en el control de los niveles intracelulares de AA libre.

En los últimos años se ha estudiado el rol de ACSL4 y su regulación en distintos procesos. En células esteroideogénicas la liberación de AA en la mitocondria involucra la acción conjunta de ACSL4 y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2), que actúan de forma concertada para regular los niveles intracelulares de AA. Este evento es obligatorio para la inducción de la proteína StAR, necesaria para el transporte de colesterol a la mitocondria. Este proceso es el paso limitante de la síntesis de todas las hormonas esteroides. ACSL4 es regulada por acción hormonal tanto en la fase aguda como crónica de la esteroideogénesis. El cerebro es también un tejido esteroideogénico ya que posee las enzimas requeridas para producir esteroides (neuroesteroides) a partir de colesterol. Los mecanismos que operan en la regulación de la producción de esteroides en sistemas esteroideogénicos clásicos están bien caracterizados, en contraste con lo descrito respecto a la producción de neuroesteroides. Dado que ACSL4 se expresa en sistema nervioso, en este trabajo se estudia su rol en células neuroesteroidogénicas.

El AA juega un rol importante en cáncer de colon, hígado, próstata y mama. En tumores cáncer de mama triple negativos se detecta una mayor expresión de ACSL4 respecto de los tejidos normales. ACSL4 confiere mayor agresividad tumoral, incrementando la migración, proliferación e invasión celular, mediante un mecanismo que involucra un aumento de la producción de eicosanoides. Además, se ha descrito que un incremento en la expresión de ACSL4 disminuye la expresión del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER), promoviendo la resistencia al tamoxifeno. En este trabajo hemos estudiado un aspecto poco caracterizado respecto a ACSL4, como los mecanismos transcripcionales que actúan sobre la regulación de los niveles de ACSL4 en los distintos modelos de cáncer de mama humano.

El rol de ACSL4 en la regulación de los niveles intracelulares de AA señala la importancia de completar la caracterización molecular y funcional de esta enzima. El objetivo general de este trabajo de tesis fue analizar aspectos regulatorios y funcionales de ACSL4 en diferentes modelos. Para responder a este objetivo, mediante técnicas de biología molecular se clonó el promotor humano de ACSL4 y se caracterizó funcionalmente en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad. Además, se evaluó la regulación de la expresión y función de ACSL4 en modelos neuroesteroidogénicos.

Se analizó la regulación transcripcional de ACSL4 en líneas de cáncer de mama de diferente agresividad. La actividad del promotor resultó ser mayor en líneas de cáncer de mama triple negativas con respecto a líneas de baja agresividad. Se demostró por primera vez que el factor de transcripción Estrogen Related Receptor Alpha (ERR $\alpha$ ) está implicado en la regulación diferencial del promotor en líneas de cáncer de mama, siendo al menos en parte responsable de la sobreexpresión de esta enzima en líneas triple negativas. El extremo 3' del promotor sería esencial para que ERR $\alpha$  pueda ejercer su acción. Se demostró que la inhibición de ACSL4 y ERR $\alpha$  produce un efecto sinérgico sobre la proliferación de células triple negativas. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que ambas moléculas estarían involucradas en el desarrollo del fenotipo agresivo. Los resultados obtenidos también indican que el ER ejercería una regulación negativa sobre la expresión de ACSL4 en células de cáncer de mama. ERR $\alpha$  y ER participarían en la regulación de la expresión diferencial de esta enzima en los distintos modelos de cáncer de mama y explicarían, en parte, su sobreexpresión en tumores triple negativos. Otros hallazgos de este trabajo sugieren la participación de los factores de transcripción ROR $\alpha$ , Sp1 y la familia E2F en la regulación del promotor humano de ACSL4.

Para analizar la regulación y función de ACSL4 en modelos neuroesteroidogénicos se empleó como modelo cultivos primarios de astrocitos de rata. Se demostró un incremento de la expresión de ACSL4 por un mecanismo dependiente de AMPc. Como ocurre en sistemas esteroideogénicos clásicos, comprobamos que esta enzima está implicada en la regulación de la expresión de StAR y en la producción de hormonas esteroideas mediada por AMPc. Por otro lado, se demostró que ACSL4 participa también en la migración y proliferación de células neuroesteroidogénicas.

En síntesis, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan conocimientos sobre la regulación y función de ACSL4. Los estudios realizados en el modelo neuroesteroidogénico amplían los conocimientos del rol de esta enzima en la

esteroidogénesis y en las funciones que cumple en células de la glía. Los resultados obtenidos en el modelo de cáncer de mama aportan conocimientos que sustentan las bases para abordar, en un futuro, el estudio de ACSL4 y  $ERR\alpha$  como nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos en la terapia del cáncer de mama altamente agresivo.

## *Referencias*

1. Fullekrug, J. and M. Poppelreuther, *Measurement of Long-Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase Activity*. Methods Mol Biol, 2016. **1376**: p. 43-53.
2. Faergeman, N.J. and J. Knudsen, *Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling*. Biochem J, 1997. **323 ( Pt 1)**: p. 1-12.
3. Knudsen, T.B., et al., *Early postimplantation embryo lethality in mice following in utero inhibition of adenosine deaminase with 2'-deoxycoformycin*. Teratology, 1989. **40(6)**: p. 615-26.
4. Sheng, Y., et al., *Identification of Elaiophyllin Skeletal Variants from the Indonesian Streptomyces sp. ICBB 9297*. J Nat Prod, 2015. **78(11)**: p. 2768-75.
5. Soupene, E. and F.A. Kuypers, *Multiple erythroid isoforms of human long-chain acyl-CoA synthetases are produced by switch of the fatty acid gate domains*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 21.
6. Oikawa, E., et al., *A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes*. J Biochem, 1998. **124(3)**: p. 679-85.
7. Kang, M.J., et al., *A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94(7)**: p. 2880-4.
8. Harizi, H., J.B. Corcuff, and N. Gualde, *Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology*. Trends Mol Med, 2008. **14(10)**: p. 461-9.
9. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10(3)**: p. 181-93.
10. Bills, T.K., J.B. Smith, and M.J. Silver, *Selective release of archidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin*. J Clin Invest, 1977. **60(1)**: p. 1-6.
11. Laposata, M., E.L. Reich, and P.W. Majerus, *Arachidonoyl-CoA synthetase. Separation from nonspecific acyl-CoA synthetase and distribution in various cells and tissues*. J Biol Chem, 1985. **260(20)**: p. 11016-20.
12. Minekura, H., et al., *Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286(1)**: p. 80-6.
13. Soupene, E. and F.A. Kuypers, *Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233(5)**: p. 507-21.
14. Hisanaga, Y., et al., *Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer*. J Biol Chem, 2004. **279(30)**: p. 31717-26.
15. Maloberti, P., et al., *Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis*. FEBS J, 2005. **272(7)**: p. 1804-14.
16. Cao, Y., et al., *Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain*. FEBS Lett, 2000. **467(2-3)**: p. 263-7.
17. Lewin, T.M., et al., *Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane*. Arch Biochem Biophys, 2002. **404(2)**: p. 263-70.
18. Duarte, A., et al., *Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis*. PLoS One, 2012. **7(9)**: p. e45829.
19. Wu, W., et al., *FUNDC1 is a novel mitochondrial-associated-membrane (MAM) protein required for hypoxia-induced mitochondrial fission and mitophagy*. Autophagy, 2016. **12(9)**: p. 1675-6.
20. Gelmetti, V., et al., *PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation*. Autophagy, 2017. **13(4)**: p. 654-669.
21. Seeger, D.R., C.C. Murphy, and E.J. Murphy, *Astrocyte arachidonate and palmitate uptake and metabolism is differentially modulated by dibutyryl-cAMP treatment*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2016. **110**: p. 16-26.



22. Bollag, W.B., *Role of phospholipases in adrenal steroidogenesis*. J Endocrinol, 2016. **229**(1): p. R29-41.
23. Schneider, C. and A. Pozzi, *Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(3-4): p. 277-94.
24. Lone, A.M. and K. Tasken, *Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 130.
25. Brash, A.R., *Arachidonic acid as a bioactive molecule*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1339-45.
26. Yin, H., et al., *Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids*. Mitochondrion, 2013. **13**(3): p. 209-24.
27. Khan, W.A., G.C. Blobe, and Y.A. Hannun, *Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C*. Cell Signal, 1995. **7**(3): p. 171-84.
28. McPhail, L.C., C.C. Clayton, and R. Snyderman, *A potential second messenger role for arachidonic acid: activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase*. Trans Assoc Am Physicians, 1984. **97**: p. 222-31.
29. Murakami, K. and A. Routtenberg, *Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca<sup>2+</sup>*. FEBS Lett, 1985. **192**(2): p. 189-93.
30. Nomura, T. and H. Ogata, *Distribution of prostaglandins in the animal kingdom*. Biochim Biophys Acta, 1976. **431**(1): p. 127-31.
31. Nadler, J.L., R. Natarajan, and N. Stern, *Specific action of the lipoxygenase pathway in mediating angiotensin II-induced aldosterone synthesis in isolated adrenal glomerulosa cells*. J Clin Invest, 1987. **80**(6): p. 1763-9.
32. Natarajan, R., et al., *Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(3): p. 584-91.
33. Natarajan, R., et al., *Role of specific isoforms of protein kinase C in angiotensin II and lipoxygenase action in rat adrenal glomerulosa cells*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **101**(1-2): p. 59-66.
34. Natarajan, R., et al., *Key role of P38 mitogen-activated protein kinase and the lipoxygenase pathway in angiotensin II actions in H295R adrenocortical cells*. Endocrine, 2002. **18**(3): p. 295-301.
35. Gu, J., et al., *12-lipoxygenase pathway increases aldosterone production, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein phosphorylation, and p38 mitogen-activated protein kinase activation in H295R human adrenocortical cells*. Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 534-43.
36. Stern, N., et al., *Potential role of 12 hydroxyeicosatetraenoic acid in angiotensin II-induced calcium signal in rat glomerulosa cells*. Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 843-7.
37. Fitzpatrick, F.A. and R. Soberman, *Regulated formation of eicosanoids*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1347-51.
38. Maloberti, P., et al., *Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 113-20.
39. Golej, D.L., et al., *Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates prostaglandin E(2) release from human arterial smooth muscle cells*. J Lipid Res, 2011. **52**(4): p. 782-93.
40. Manna, P.R., et al., *Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease*. Endocrine, 2016. **51**(1): p. 7-21.
41. Reddy, D.S. and W.A. Estes, *Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(7): p. 543-561.
42. Baulieu, E.E. and P. Robel, *Neurosteroids: a new brain function?* J Steroid Biochem Mol Biol, 1990. **37**(3): p. 395-403.
43. Robel, P. and E.E. Baulieu, *Neurosteroids: biosynthesis and function*. Crit Rev Neurobiol, 1995. **9**(4): p. 383-94.

44. Gwynne, J.T. and D.D. Mahaffee, *Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 8141-50.
45. Kovanen, P.T., et al., *Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo*. J Biol Chem, 1980. **255**(12): p. 5591-8.
46. Privalle, C.T., J.F. Crivello, and C.R. Jefcoate, *Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(3): p. 702-6.
47. Crivello, J.F. and C.R. Jefcoate, *Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors*. J Biol Chem, 1980. **255**(17): p. 8144-51.
48. Cooke, B.A. and A.J. van der Kemp, *Protein kinase activity in rat testis interstitial tissue. Effect of luteinizing hormone and other factors*. Biochem J, 1976. **154**(2): p. 371-8.
49. Podesta, E.J., M.L. Dufau, and K.J. Catt, *Characterization of two forms of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat testicular interstitial cells*. Mol Cell Endocrinol, 1976. **5**(1-2): p. 109-22.
50. Podesta, E.J., M.L. Dufau, and K.J. Catt, *Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase of rat Leydig cells: physical characteristics of two holoenzymes and their subunits*. Biochemistry, 1978. **17**(8): p. 1566-73.
51. Sluchanko, N.N., K.V. Tugaeva, and E.G. Maksimov, *Solution structure of human steroidogenic acute regulatory protein STARD1 studied by small-angle X-ray scattering*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **489**(4): p. 445-450.
52. Jefcoate, C., *High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 881-90.
53. Karaboyas, G.C. and S.B. Koritz, *The Transformation of Delta-5-Pregnenolone and Progesterone to Cortisol by Rat Adrenal Slices and the Effect of Acth and Adenosine 3',5'-Monophosphate Upon It*. Biochim Biophys Acta, 1965. **100**: p. 600-2.
54. Lambeth, J.D., X.X. Xu, and M. Glover, *Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450<sub>sc</sub>. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9181-8.
55. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
56. Krueger, R.J. and N.R. Orme-Johnson, *Acute adrenocorticotropic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 10159-67.
57. Pon, L.A., J.A. Hartigan, and N.R. Orme-Johnson, *Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein*. J Biol Chem, 1986. **261**(28): p. 13309-16.
58. Pon, L.A. and N.R. Orme-Johnson, *Acute stimulation of corpus luteum cells by gonadotrophin or adenosine 3',5'-monophosphate causes accumulation of a phosphoprotein concurrent with acceleration of steroid synthesis*. Endocrinology, 1988. **123**(4): p. 1942-8.
59. Stocco, D.M. and M.W. Kilgore, *Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin*. Biochem J, 1988. **249**(1): p. 95-103.
60. Epstein, L.F. and N.R. Orme-Johnson, *Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone synthesis*. Mol Cell Endocrinol, 1991. **81**(1-3): p. 113-26.
61. Stocco, D.M. and T.C. Sodeman, *The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19731-8.
62. Stocco, D.M., *The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future*. J Endocrinol, 2000. **164**(3): p. 247-53.
63. Papadopoulos, V., et al., *Structure, function and regulation of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor*. Therapie, 2001. **56**(5): p. 549-56.

64. Lacapere, J.J. and V. Papadopoulos, *Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis*. Steroids, 2003. **68**(7-8): p. 569-85.
65. Rajapaksha, M., et al., *Cholesterol-mediated conformational changes in the steroidogenic acute regulatory protein are essential for steroidogenesis*. Biochemistry, 2013. **52**(41): p. 7242-53.
66. Clark, B.J., *ACTH Action on StAR Biology*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 547.
67. Kusakabe, M., et al., *Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes*. J Endocrinol, 2006. **189**(3): p. 541-54.
68. Poderoso, C., et al., *A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1443.
69. Paz, C., et al., *Role of Protein Phosphorylation and Tyrosine Phosphatases in the Adrenal Regulation of Steroid Synthesis and Mitochondrial Function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 60.
70. Xie, T., et al., *[Clinical features and StAR gene mutations in children with congenital lipoid adrenal hyperplasia]*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2015. **17**(5): p. 472-6.
71. Lin, D., et al., *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1828-31.
72. Caron, K.M., et al., *Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11540-5.
73. Cooke, B.A., et al., *Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis Leydig cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(1-3): p. 465-71.
74. Moraga, P.F., M.N. Llanos, and A.M. Ronco, *Arachidonic acid release from rat Leydig cells depends on the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin receptors*. J Endocrinol, 1997. **154**(2): p. 201-9.
75. Solano, A.R., L. Dada, and E.J. Podesta, *Lipoxygenase products as common intermediates in cyclic AMP-dependent and -independent adrenal steroidogenesis in rats*. J Mol Endocrinol, 1988. **1**(2): p. 147-54.
76. Didolkar, A.K. and K. Sundaram, *Arachidonic acid is involved in the regulation of hCG induced steroidogenesis in rat Leydig cells*. Life Sci, 1987. **41**(4): p. 471-7.
77. Abayasekara, D.R., A.M. Band, and B.A. Cooke, *Evidence for the involvement of phospholipase A2 in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat testis Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 1990. **70**(2): p. 147-53.
78. Mele, P.G., et al., *Site of action of proteinases in the activation of steroidogenesis in rat adrenal gland*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1310**(3): p. 260-8.
79. Nishikawa, T., et al., *Possible involvement of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of pregnenolone synthesis in bovine adrenocortical mitochondria*. J Biochem, 1994. **116**(4): p. 833-7.
80. Omura, M., et al., *Transformation of arachidonic acid by 5- and 15-lipoxygenase pathways in bovine adrenal fasciculata cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990. **40**(2): p. 93-102.
81. Wang, X.J., et al., *Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 159-66.
82. Wang, X., et al., *The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20204-9.
83. Wang, X., et al., *The involvement of epoxygenase metabolites of arachidonic acid in cAMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression*. J Endocrinol, 2006. **190**(3): p. 871-8.

84. Maloberti, P., et al., *Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells*. Eur J Biochem, 2002. **269**(22): p. 5599-607.
85. Castillo, A.F., et al., *cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells*. FEBS J, 2006. **273**(22): p. 5011-21.
86. Cornejo Maciel, F., et al., *An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormone-dependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 655-66.
87. Finkelstein, C.V., et al., *A novel arachidonic acid-related thioesterase involved in acute steroidogenesis*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 363-71.
88. Svensson, L.T., et al., *Molecular cloning and characterization of a mitochondrial peroxisome proliferator-induced acyl-CoA thioesterase from rat liver*. Biochem J, 1998. **329** ( Pt 3): p. 601-8.
89. Hunt, M.C. and S.E. Alexson, *The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism*. Prog Lipid Res, 2002. **41**(2): p. 99-130.
90. Yamada, J., *Long-chain acyl-CoA hydrolase in the brain*. Amino Acids, 2005. **28**(3): p. 273-8.
91. Grevengoed, T.J., E.L. Klett, and R.A. Coleman, *Acyl-CoA metabolism and partitioning*. Annu Rev Nutr, 2014. **34**: p. 1-30.
92. Papadopoulos, V., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders*. Neuroscience, 2006. **138**(3): p. 749-56.
93. Kolmer, M., A. Rovio, and H. Alho, *The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans*. Biochem J, 1995. **306** ( Pt 2): p. 327-30.
94. Gwynne, J.T. and B. Hess, *The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis*. J Biol Chem, 1980. **255**(22): p. 10875-83.
95. Knudsen, J., et al., *Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence*. Biochem J, 1989. **262**(2): p. 513-9.
96. Papadopoulos, V., *Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function*. Endocr Rev, 1993. **14**(2): p. 222-40.
97. Papadopoulos, V., *Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **217**(2): p. 130-42.
98. Veenman, L. and M. Gavish, *The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression*. Curr Mol Med, 2012. **12**(4): p. 398-412.
99. Maloberti, P., et al., *Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis*. Febs J, 2005. **272**(7): p. 1804-14.
100. Maloberti, P., et al., *Regulation of arachidonic acid release in steroidogenesis: role of a new acyl-CoA thioestrerase (ARTIST)*. Endocr Res, 2000. **26**(4): p. 653-62.
101. Maloberti, P., et al., *Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 113-20.
102. Castilla, R., et al., *New enzymes involved in the mechanism of action of epidermal growth factor in a clonal strain of Leydig tumor cells*. Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3743-52.
103. Maloberti, P.M., et al., *ACSL4*, in *Encyclopedia of Signaling Molecules*, S. Choi, Editor. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 1-8.
104. Yang, W.S. and B.R. Stockwell, *Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(3): p. 165-176.
105. Yuan, H., et al., *Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **478**(3): p. 1338-43.
106. Doll, S., et al., *ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition*. Nat Chem Biol, 2017. **13**(1): p. 91-98.

107. Muller, T., et al., *Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(19): p. 3631-3645.
108. Miyares, R.L., et al., *Long-chain Acyl-CoA synthetase 4A regulates Smad activity and dorsoventral patterning in the zebrafish embryo*. Dev Cell, 2013. **27**(6): p. 635-47.
109. Mele, P.G., et al., *Role of intramitochondrial arachidonic acid and acyl-CoA synthetase 4 in angiotensin II-regulated aldosterone synthesis in NCI-H295R adrenocortical cell line*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3284-94.
110. Cho, Y.Y., et al., *Regulation by adrenocorticotrophic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(3): p. 741-5.
111. Paz, C., et al., *Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland*. Eur J Biochem, 1999. **265**(3): p. 911-8.
112. Poderoso, C., et al., *The obligatory action of protein tyrosine phosphatases in ACTH-stimulated steroidogenesis is exerted at the level of StAR protein*. Endocr Res, 2002. **28**(4): p. 413-7.
113. Poderoso, C., et al., *Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells*. Endocr Res, 2002. **28**(4): p. 319-23.
114. Cornejo Maciel, F., et al., *LH/chorionic gonadotropin signaling pathway involves protein tyrosine phosphatase activity downstream of protein kinase A activation: evidence of an obligatory step in steroid production by Leydig cells*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 403-11.
115. Paz, C., et al., *Protein tyrosine phosphatases are involved in LH/chorionic gonadotropin and 8Br-cAMP regulation of steroidogenesis and StAR protein levels in MA-10 Leydig cells*. J Endocrinol, 2002. **175**(3): p. 793-801.
116. Cooke, M., et al., *Tyrosine phosphatase SHP2 regulates the expression of acyl-CoA synthetase ACSL4*. J Lipid Res, 2011. **52**(11): p. 1936-48.
117. Cooke, M., et al., *Tyrosine phosphatases as key regulators of StAR induction and cholesterol transport: SHP2 as a potential tyrosine phosphatase involved in steroid synthesis*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **336**(1-2): p. 63-9.
118. Cano, F., et al., *Protein tyrosine phosphatases regulate arachidonic acid release, StAR induction and steroidogenesis acting on a hormone-dependent arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. **99**(4-5): p. 197-202.
119. Orlando, U., et al., *Characterization of the mouse promoter region of the acyl-CoA synthetase 4 gene: role of Sp1 and CREB*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **369**(1-2): p. 15-26.
120. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
121. Carninci, P., et al., *Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 626-35.
122. Emami, K.H., T.W. Burke, and S.T. Smale, *Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(3): p. 839-46.
123. Choy, B., et al., *How eukaryotic transcription activators increase assembly of preinitiation complexes*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1993. **58**: p. 199-203.
124. Kan, C.F., et al., *Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation*. J Lipid Res, 2014. **55**(8): p. 1657-67.
125. Smith, M.E., et al., *Long-chain acyl-CoA synthetase 4 is regulated by phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(1): p. 272-7.
126. Kaller, M., et al., *Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(8): p. M111 010462.
127. Banyard, J. and D.R. Bielenberg, *The role of EMT and MET in cancer dissemination*. Connect Tissue Res, 2015. **56**(5): p. 403-13.

128. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
129. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
130. Eccles, S.A. and D.R. Welch, *Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1742-57.
131. Zanotti, S. and E. Canalis, *Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders*. Calcif Tissue Int, 2012. **90**(2): p. 69-75.
132. Haraguchi, M., *The role of the transcriptional regulator snail in cell detachment, reattachment and migration*. Cell Adh Migr, 2009. **3**(3): p. 259-63.
133. Guan, X., *Cancer metastases: challenges and opportunities*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(5): p. 402-18.
134. Gilbert, J.A., *Potential therapeutic target for triple-negative breast cancer*. Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. e330.
135. Crago, A.M., et al., *Randomized clinical trials in breast cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2010. **19**(1): p. 33-58.
136. Clarke, S.C., et al., *Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1497-502.
137. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
138. Wahba, H.A. and H.A. El-Hadaad, *Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer*. Cancer Biol Med, 2015. **12**(2): p. 106-16.
139. Yeh, J., et al., *Clinical Characteristics in Patients with Triple Negative Breast Cancer*. Int J Breast Cancer, 2017. **2017**: p. 1796145.
140. Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro, 1978. **14**(11): p. 911-5.
141. Cailleau, R., et al., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(3): p. 661-74.
142. Engel, L.W. and N.A. Young, *Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 2): p. 4327-39.
143. Hackett, A.J., et al., *Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(6): p. 1795-806.
144. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
145. Keydar, I., et al., *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. Eur J Cancer, 1979. **15**(5): p. 659-70.
146. Sommers, C.L., et al., *Regulation of vimentin gene transcription in human breast cancer cell lines*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(8): p. 839-46.
147. Thompson, E.W., et al., *Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines*. J Cell Physiol, 1992. **150**(3): p. 534-44.
148. Orlando, U.D., et al., *Acyl-CoA synthetase-4, a new regulator of mTOR and a potential therapeutic target for enhanced estrogen receptor function in receptor-positive and -negative breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(40): p. 42632-50.
149. Orlando, U.D., et al., *The functional interaction between Acyl-CoA synthetase 4, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: a novel therapeutic target*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40794.
150. Mota, A.L., et al., *Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers*. Oncol Lett, 2017. **13**(6): p. 4708-4712.

151. Maloberti, P.M., et al., *Functional interaction between acyl-CoA synthetase 4, lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15540.
152. Wang, M.T., K.V. Honn, and D. Nie, *Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 525-34.
153. Gonzalez-Periz, A. and J. Claria, *New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways*. Curr Top Med Chem, 2007. **7**(3): p. 297-309.
154. Hyde, C.A. and S. Missailidis, *Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(6): p. 701-15.
155. Pidgeon, G.P., et al., *Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 503-24.
156. Cao, Y., et al., *Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(23): p. 8429-34.
157. Wu, X., et al., *ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44849-63.
158. Sakai, M., et al., *Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 606.
159. Sun, X.J. and G.L. Xu, *Overexpression of Acyl-CoA Ligase 4 (ACSL4) in Patients with Hepatocellular Carcinoma and its Prognosis*. Med Sci Monit, 2017. **23**: p. 4343-4350.
160. Villegas-Comonfort, S., et al., *Arachidonic acid promotes migration and invasion through a PI3K/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2014. **90**(5): p. 169-77.
161. Harris, R.E., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. Inflammopharmacology, 2009. **17**(2): p. 55-67.
162. Cox, T.R., A. Gartland, and J.T. Erler, *Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis*. Cancer Res, 2016. **76**(2): p. 188-92.
163. Kasashima, H., et al., *Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia*. Gastric Cancer, 2016. **19**(2): p. 431-42.
164. Osawa, T., et al., *Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis*. Br J Cancer, 2013. **109**(8): p. 2237-47.
165. Perryman, L. and J.T. Erler, *Lysyl oxidase in cancer research*. Future Oncol, 2014. **10**(9): p. 1709-17.
166. Shih, Y.H., et al., *Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2013. **35**(2): p. 250-6.
167. Boufraquech, M., et al., *miR30a inhibits LOX expression and anaplastic thyroid cancer progression*. Cancer Res, 2015. **75**(2): p. 367-77.
168. Kirschmann, D.A., et al., *A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4478-83.
169. Ma, B.J., et al., *[Effect of lysyl oxidase on migration and adhesion of human gastric cancer HGC-27 cells in vitro]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2011. **33**(5): p. 331-3.
170. Baker, A.M., et al., *The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(5): p. 407-24.
171. Cao, Y. and S.M. Prescott, *Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer*. J Cell Physiol, 2002. **190**(3): p. 279-86.
172. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1063-73.
173. Ristimaki, A., et al., *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 632-5.
174. Secchiero, P., et al., *Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells*. Am J Pathol, 2005. **167**(6): p. 1599-607.
175. Noonan, D.M., et al., *Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 31-40.

176. Smith, B.J., M.R. Wills, and J. Savory, *Prostaglandins and cancer*. Ann Clin Lab Sci, 1983. **13**(5): p. 359-65.
177. Sung, Y.K., et al., *Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Sci, 2003. **94**(5): p. 421-4.
178. Monaco, M.E., et al., *Expression of Long-chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 in Breast and Prostate Cancers Is Associated with Sex Steroid Hormone Receptor Negativity*. Transl Oncol, 2010. **3**(2): p. 91-8.
179. Wu, X., et al., *Long chain fatty Acyl-CoA synthetase 4 is a biomarker for and mediator of hormone resistance in human breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77060.
180. Xia, H., et al., *Simultaneous silencing of ACSL4 and induction of GADD45B in hepatocellular carcinoma cells amplifies the synergistic therapeutic effect of aspirin and sorafenib*. Cell Death Discov, 2017. **3**: p. 17058.
181. Azevedo, F.A., et al., *Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain*. J Comp Neurol, 2009. **513**(5): p. 532-41.
182. Guillamon-Vivancos, T., U. Gomez-Pinedo, and J. Matias-Guiu, *Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description*. Neurologia, 2015. **30**(2): p. 119-29.
183. Allen, N.J. and B.A. Barres, *Neuroscience: Glia - more than just brain glue*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 675-7.
184. Tower, D.B., *The role of astroglia as modulators of neuronal function in cerebral cortex: comparative data, and observations in vivo and in vitro in fluid, electrolyte and amino acid interrelationships*. Vopr Biokhim Mozga, 1973. **8**: p. 269-88.
185. Rasband, M.N., *Glial Contributions to Neural Function and Disease*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(2): p. 355-61.
186. Halassa, M.M., T. Fellin, and P.G. Haydon, *The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease*. Trends Mol Med, 2007. **13**(2): p. 54-63.
187. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
188. Filosa, J.A., et al., *Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone*. Neuroscience, 2016. **323**: p. 96-109.
189. MacVicar, B.A. and E.A. Newman, *Astrocyte regulation of blood flow in the brain*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(5).
190. Gordon, G.R., S.J. Mulligan, and B.A. MacVicar, *Astrocyte control of the cerebrovasculature*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1214-21.
191. Zonta, M., et al., *Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 43-50.
192. Metea, M.R. and E.A. Newman, *Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling*. J Neurosci, 2006. **26**(11): p. 2862-70.
193. Schummers, J., H. Yu, and M. Sur, *Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1638-43.
194. Wolf, F. and F. Kirchhoff, *Neuroscience. Imaging astrocyte activity*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1597-9.
195. Takano, T., et al., *Two-photon imaging of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1097**: p. 40-50.
196. Volterra, A. and J. Meldolesi, *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(8): p. 626-40.
197. Simard, M. and M. Nedergaard, *The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 877-96.
198. Powell, H.C., et al., *Response of glia, mast cells and the blood brain barrier, in transgenic mice expressing interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination*. Brain Pathol, 1999. **9**(2): p. 219-35.



199. Kang, J., et al., *Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission*. Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 683-92.
200. Fellin, T., et al., *Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors*. Neuron, 2004. **43**(5): p. 729-43.
201. Shigetomi, E., et al., *Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons*. J Neurosci, 2008. **28**(26): p. 6659-63.
202. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*. Trends Neurosci, 1999. **22**(5): p. 208-15.
203. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. Trends Neurosci, 2009. **32**(8): p. 421-31.
204. Chung, W.S., et al., *Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 394-400.
205. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2074-7.
206. Morshead, C.M., et al., *Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1071-82.
207. Alvarez-Buylla, A. and J.M. Garcia-Verdugo, *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 629-34.
208. Luskin, M.B., *Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate*. J Neurobiol, 1998. **36**(2): p. 221-33.
209. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
210. Irwin, R.W., et al., *Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(1): p. 236-48.
211. Laywell, E.D., et al., *Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13883-8.
212. Skogh, C., et al., *Generation of regionally specified neurons in expanded glial cultures derived from the mouse and human lateral ganglionic eminence*. Mol Cell Neurosci, 2001. **17**(5): p. 811-20.
213. Bozoyan, L., J. Khachatryan, and A. Saghatelian, *Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling*. J Neurosci, 2012. **32**(5): p. 1687-704.
214. Burda, J.E. and M.V. Sofroniew, *Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease*. Neuron, 2014. **81**(2): p. 229-48.
215. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
216. Birch, A.M., *The contribution of astrocytes to Alzheimer's disease*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(5): p. 1316-20.
217. Devinsky, O., et al., *Glia and epilepsy: excitability and inflammation*. Trends Neurosci, 2013. **36**(3): p. 174-84.
218. Labombarda, F., et al., *Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury*. Exp Neurol, 2011. **231**(1): p. 135-46.
219. Norenberg, M.D., *Astrocyte responses to CNS injury*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(3): p. 213-20.
220. Pekny, M. and M. Pekna, *Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits*. Physiol Rev, 2014. **94**(4): p. 1077-98.
221. Revsin, Y., et al., *Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes*. Brain Res, 2005. **1038**(1): p. 22-31.

222. Saravia, F.E., et al., *Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice*. Brain Res, 2002. **957**(2): p. 345-53.
223. Gleichman, A.J. and S.T. Carmichael, *Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke*. Neurosci Lett, 2014. **565**: p. 47-52.
224. Benarroch, E.E., *Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system*. Mayo Clin Proc, 2005. **80**(10): p. 1326-38.
225. Garay, L., et al., *Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(3-5): p. 228-37.
226. Gao, K., et al., *Traumatic scratch injury in astrocytes triggers calcium influx to activate the JNK/c-Jun/AP-1 pathway and switch on GFAP expression*. Glia, 2013. **61**(12): p. 2063-77.
227. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.
228. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. **50**(4): p. 427-34.
229. Wang, L.P., et al., *Mild brain ischemia induces unique physiological properties in striatal astrocytes*. Glia, 2008. **56**(9): p. 925-34.
230. Yuan, Y.M. and C. He, *The glial scar in spinal cord injury and repair*. Neurosci Bull, 2013. **29**(4): p. 421-35.
231. Goritz, C., et al., *A pericyte origin of spinal cord scar tissue*. Science, 2011. **333**(6039): p. 238-42.
232. Sofroniew, M.V., *Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(5): p. 249-63.
233. Sharma, K., M.E. Selzer, and S. Li, *Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS*. Exp Neurol, 2012. **237**(2): p. 370-8.
234. Brambilla, R. and M.P. Abbracchio, *Modulation of cyclooxygenase-2 and brain reactive astrogliosis by purinergic P2 receptors*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **939**: p. 54-62.
235. Dagainakatte, G.C., et al., *Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines*. Exp Neurol, 2008. **210**(1): p. 261-7.
236. Abbracchio, M.P. and C. Verderio, *Pathophysiological roles of P2 receptors in glial cells*. Novartis Found Symp, 2006. **276**: p. 91-103; discussion 103-12, 275-81.
237. Neary, J.T., *Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms*. Ciba Found Symp, 1996. **198**: p. 130-9; discussion 139-41.
238. Neary, J.T., et al., *Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway*. J Neurosci, 1999. **19**(11): p. 4211-20.
239. Minghetti, L., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in cultured microglia by prostaglandin E2, cyclic AMP and non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(5): p. 934-40.
240. Palma, C., et al., *Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production*. Glia, 1997. **21**(2): p. 183-93.
241. Bochen, D., et al., *7beta-hydroxysterol is cytotoxic to neonatal rat astrocytes in primary culture when cAMP levels are increased*. J Neurosci Res, 2000. **62**(1): p. 99-111.
242. Fedoroff, S., et al., *Astrocyte cell lineage. V. Similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo*. J Neurosci Res, 1984. **12**(1): p. 14-27.
243. Miller, C., O. Tsatas, and S. David, *Dibutyryl cAMP, interleukin-1 beta, and macrophage conditioned medium enhance the ability of astrocytes to promote neurite growth*. J Neurosci Res, 1994. **38**(1): p. 56-63.

244. Tiriyaki, V.M., et al., *Differentiation of reactive-like astrocytes cultured on nanofibrillar and comparative culture surfaces*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(4): p. 529-45.
245. Bolton, S., et al., *Regulation of the astrocyte resting membrane potential by cyclic AMP and protein kinase A*. Glia, 2006. **54**(4): p. 316-28.
246. Hsiao, H.Y., et al., *TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling*. Glia, 2007. **55**(2): p. 214-23.
247. Siushansian, R., et al., *Cerebral astrocytes transport ascorbic acid and dehydroascorbic acid through distinct mechanisms regulated by cyclic AMP*. J Neurochem, 1997. **68**(6): p. 2378-85.
248. Bayatti, N. and J. Engele, *Cyclic AMP differentially regulates the expression of fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in cultured cortical astroglia*. Neuroscience, 2002. **114**(1): p. 81-9.
249. Odemis, V., et al., *Interleukin-6 and cAMP induce stromal cell-derived factor-1 chemotaxis in astroglia by up-regulating CXCR4 cell surface expression. Implications for brain inflammation*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39801-8.
250. Baulieu, E.E., *Steroid hormones in the brain: Several mechanisms?* Steroid Hormone Regulation of the Brain, 1981: p. 3-14.
251. Romo-Parra, H., et al., *Neurosteroids increase tonic GABAergic inhibition in the lateral section of the central amygdala in mice*. J Neurophysiol, 2015. **113**(9): p. 3421-31.
252. Ito, J., et al., *Apolipoprotein A-I induces translocation of protein kinase C[alpha] to a cytosolic lipid-protein particle in astrocytes*. J Lipid Res, 2004. **45**(12): p. 2269-76.
253. Dietschy, J.M. and S.D. Turley, *Cholesterol metabolism in the brain*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 105-12.
254. Charlier, T.D., et al., *Local modulation of steroid action: rapid control of enzymatic activity*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 83.
255. Diotel, N., et al., *Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(1): p. 45-56.
256. do Rego, J.L. and H. Vaudry, *Comparative aspects of neurosteroidogenesis: From fish to mammals*. Gen Comp Endocrinol, 2016. **227**: p. 120-9.
257. Tsutsui, K., et al., *Biosynthesis and biological actions of pineal neurosteroids in domestic birds*. Neuroendocrinology, 2013. **98**(2): p. 97-105.
258. Vaudry, H., et al., *Neurosteroid biosynthesis in the brain of amphibians*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 79.
259. Porcu, P., et al., *Neurosteroidogenesis today: Novel targets for neuroactive steroid synthesis and action and their relevance for translational research*. J Neuroendocrinol., 2016. **28**(2).
260. Coirini, H., et al., *3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord*. Neuroscience, 2002. **113**(4): p. 883-91.
261. Labombarda, F., et al., *Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry*. Endocrinology, 2006. **147**(4): p. 1847-59.
262. Zwain, I.H. and S.S. Yen, *Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3843-52.
263. Micevych, P.E., et al., *Estradiol stimulates progesterone synthesis in hypothalamic astrocyte cultures*. Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 782-9.
264. Sinchak, K., et al., *Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes*. Dev Neurosci, 2003. **25**(5): p. 343-8.
265. Soma, K.K., et al., *Neurosteroids and female reproduction: estrogen increases 3beta-HSD mRNA and activity in rat hypothalamus*. Endocrinology, 2005. **146**(10): p. 4386-90.
266. Akwa, Y., et al., *Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density*. J Cell Biol, 1993. **121**(1): p. 135-43.
267. Purdy, S.J., B.J. Whitehouse, and D.R. Abayasekara, *Stimulation of steroidogenesis by forskolin in rat adrenal zona glomerulosa cell preparations*. J Endocrinol, 1991. **129**(3): p. 391-7.

268. Micevych, P.E. and P. Dewing, *Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 26.
269. Santillo, A., et al., *Seasonal changes and sexual dimorphism in gene expression of StAR protein, steroidogenic enzymes and sex hormone receptors in the frog brain*. Gen Comp Endocrinol, 2017. **246**: p. 226-232.
270. Stein, D.G. and I. Sayeed, *Repurposing and repositioning neurosteroids in the treatment of traumatic brain injury: A report from the trenches*. Neuropharmacology, 2018.
271. Zheng, H., et al., *Neuroactive Steroids and Related Steroids in Autism Spectrum Disorders*. Neuropsychiatry (London), 2018. **8**(2): p. 468-476.
272. Strous, R.D., et al., *Hormonal response to dehydroepiandrosterone administration in schizophrenia: findings from a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study*. J Clin Psychopharmacol, 2008. **28**(4): p. 456-9.
273. Hedges, V.L., et al., *Local Estrogen Synthesis Regulates Parallel Fiber-Purkinje Cell Neurotransmission Within the Cerebellar Cortex*. Endocrinology, 2018. **159**(3): p. 1328-1338.
274. Sakamoto, H., et al., *Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell*. Endocrinology, 2003. **144**(10): p. 4466-77.
275. Sakamoto, H., K. Ukena, and K. Tsutsui, *Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 6221-32.
276. Sakamoto, H., K. Ukena, and K. Tsutsui, *Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats*. Neurosci Lett, 2002. **322**(2): p. 111-5.
277. Labombarda, F., et al., *Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury*. Glia, 2009. **57**(8): p. 884-97.
278. Srivastava, D.P., K.M. Woolfrey, and P. Penzes, *Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(4): p. 1318-50.
279. Brus, M., et al., *Estradiol-induced neurogenesis in the female accessory olfactory bulb is required for the learning of the male odor*. J Neurochem, 2016. **138**(3): p. 457-68.
280. Karishma, K.K. and J. Herbert, *Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(3): p. 445-53.
281. Mayo, W., et al., *Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(1): p. 103-14.
282. Furukawa, A., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain*. J Neurochem, 1998. **71**(6): p. 2231-8.
283. King, S.R., et al., *An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain*. J Neurosci, 2002. **22**(24): p. 10613-20.
284. Kim, H.J., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein expression in the normal human brain and intracranial tumors*. Brain Res, 2003. **978**(1-2): p. 245-9.
285. Li, Y.Y., K. Inoue, and Y. Takei, *Steroidogenic acute regulatory protein in eels: cDNA cloning and effects of ACTH and seawater transfer on its mRNA expression*. Zoolog Sci, 2003. **20**(2): p. 211-9.
286. London, S.E., et al., *Widespread capacity for steroid synthesis in the avian brain and song system*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5975-87.
287. London, S.E. and B.A. Schlinger, *Steroidogenic enzymes along the ventricular proliferative zone in the developing songbird brain*. J Comp Neurol, 2007. **502**(4): p. 507-21.

288. Guennoun, R., et al., *A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase (3 beta-HSD), is expressed in rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **30**(2): p. 287-300.
289. Compagnone, N.A., et al., *Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system*. Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 5212-23.
290. King, S.R., et al., *The steroidogenic acute regulatory protein is expressed in steroidogenic cells of the day-old brain*. Endocrinology, 2004. **145**(10): p. 4775-80.
291. Mellon, S.H. and C.F. Deschepper, *Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain*. Brain Res, 1993. **629**(2): p. 283-92.
292. Sierra, A., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1458-67.
293. Lavaque, E., et al., *Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450sc, and aromatase in the olivocerebellar system*. J Neurobiol, 2006. **66**(3): p. 308-18.
294. Tsutsui, K., *Biosynthesis and organizing action of neurosteroids in the developing Purkinje cell*. Cerebellum, 2006. **5**(2): p. 89-96.
295. Liu, T., et al., *Luteinizing hormone receptor mediates neuronal pregnenolone production via up-regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression*. J Neurochem, 2007. **100**(5): p. 1329-39.
296. Arakane, F., et al., *Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32656-62.
297. Karri, S., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein expression and pregnenolone synthesis in rat astrocyte cultures*. J Neuroendocrinol, 2007. **19**(11): p. 860-9.
298. Papadopoulos, V. and P. Guarneri, *Regulation of C6 glioma cell steroidogenesis by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*. Glia, 1994. **10**(1): p. 75-8.
299. Roscetti, G., et al., *Modulatory mechanisms of cyclic AMP-stimulated steroid content in rat brain cortex*. Eur J Pharmacol, 1994. **269**(1): p. 17-24.
300. Benmessahel, Y., et al., *Downregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by cyclic AMP in cultured Schwann cells*. Glia, 2004. **45**(3): p. 213-28.
301. Rosati, F., et al., *Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **124**(3-5): p. 77-83.
302. Selvaraj, V., D.M. Stocco, and L.N. Tu, *Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(4): p. 490-501.
303. Garcia-Ovejero, D., et al., *Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury*. J Comp Neurol, 2002. **450**(3): p. 256-71.
304. Garcia-Segura, L.M., et al., *Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair*. Neuroscience, 1999. **89**(2): p. 567-78.
305. Schumacher, M., et al., *Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects*. J Neurocytol, 2000. **29**(5-6): p. 307-26.
306. Garcia-Segura, L.M., I. Azcoitia, and L.L. DonCarlos, *Neuroprotection by estradiol*. Prog Neurobiol, 2001. **63**(1): p. 29-60.
307. Kozorovitskiy, Y. and E. Gould, *Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair?* J Clin Exp Neuropsychol, 2003. **25**(5): p. 721-32.
308. Kimoto, T., et al., *Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis*. Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3578-89.
309. Fester, L., et al., *Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis*. J Neurochem, 2006. **97**(4): p. 1136-44.
310. Prange-Kiel, J., et al., *Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons*. Hippocampus, 2006. **16**(5): p. 464-71.

311. von Schassen, C., et al., *Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth*. J Neuroendocrinol, 2006. **18**(11): p. 847-56.
312. Prange-Kiel, J. and G.M. Rune, *Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus*. Neuroscience, 2006. **138**(3): p. 765-72.
313. Serra, M., et al., *Changes in neuroactive steroid content during social isolation stress modulate GABAA receptor plasticity and function*. Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 520-30.
314. Serra, M., et al., *Social isolation stress and neuroactive steroids*. Eur Neuropsychopharmacol, 2007. **17**(1): p. 1-11.
315. Uzunova, V., et al., *Region-specific dysregulation of allopregnanolone brain content in the olfactory bulbectomized rat model of depression*. Brain Res, 2003. **976**(1): p. 1-8.
316. Pibiri, F., et al., *Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during social isolation enhances contextual fear: A model relevant for posttraumatic stress disorder*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5567-72.
317. Liu, A., et al., *Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke*. Endocrinology, 2012. **153**(8): p. 3747-57.
318. Meffre, D., et al., *Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2505-17.
319. Labombarda, F., et al., *Neuroprotection by steroids after neurotrauma in organotypic spinal cord cultures: a key role for progesterone receptors and steroidal modulators of GABA(A) receptors*. Neuropharmacology, 2013. **71**: p. 46-55.
320. De Nicola, A.F., et al., *Neurosteroidogenesis and progesterone anti-inflammatory/neuroprotective effects*. J Neuroendocrinol., 2018. **30**: p. e12502.
321. Djebaili, M., et al., *The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats*. J Neurotrauma, 2005. **22**(1): p. 106-18.
322. Djebaili, M., S.W. Hoffman, and D.G. Stein, *Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex*. Neuroscience, 2004. **123**(2): p. 349-59.
323. El-Etr, M., et al., *Progesterone and nestorone promote myelin regeneration in chronic demyelinating lesions of corpus callosum and cerebral cortex*. Glia, 2015. **63**(1): p. 104-17.
324. Giatti, S., et al., *Neuroprotective effects of progesterone in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(6): p. 851-61.
325. Griffin, L.D., et al., *Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 704-11.
326. Guennoun, R., et al., *Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **146**: p. 48-61.
327. Brinton, R.D., *Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(4): p. 241-50.
328. Noorbakhsh, F., et al., *Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis*. Brain, 2011. **134**(Pt 9): p. 2703-21.
329. Panzica, G.C., et al., *Milestones on Steroids and the Nervous System: 10 years of basic and translational research*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(1): p. 1-15.
330. Sayeed, I., et al., *Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion*. Ann Emerg Med, 2006. **47**(4): p. 381-9.
331. Sayeed, I., et al., *Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone*. Brain Res, 2009. **1263**: p. 165-73.

332. Adeosun, S.O., et al., *Allopregnanolone reinstates tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and motor performance in an MPTP-lesioned mouse model of Parkinson's disease*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50040.
333. Giatti, S., et al., *Dihydrotestosterone as a Protective Agent in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Neuroendocrinology, 2015. **101**(4): p. 296-308.
334. Sayeed, I. and D.G. Stein, *Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury*. Prog Brain Res, 2009. **175**: p. 219-37.
335. Ciriza, I., et al., *Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective*. J Neurobiol, 2006. **66**(9): p. 916-28.
336. Melcangi, R.C., et al., *Modifications of neuroactive steroid levels in an experimental model of nigrostriatal degeneration: potential relevance to the pathophysiology of Parkinson's disease*. J Mol Neurosci, 2012. **46**(1): p. 177-83.
337. Eidelberg, E., et al., *Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions*. Brain Res Bull, 1989. **22**(1): p. 39-45.
338. McIlwain, D.L. and V.B. Hoke, *The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons*. BMC Neurosci, 2005. **6**: p. 19.
339. Grossman, K.J., C.W. Goss, and D.G. Stein, *Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat*. Brain Res, 2004. **1008**(1): p. 29-39.
340. Li, G.L., et al., *Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord*. Acta Neuropathol, 1999. **98**(5): p. 473-80.
341. Rosenberg, L.J., L.J. Zai, and J.R. Wrathall, *Chronic alterations in the cellular composition of spinal cord white matter following contusion injury*. Glia, 2005. **49**(1): p. 107-20.
342. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 871-927.
343. McTigue, D.M. and R.B. Tripathi, *The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS*. J Neurochem, 2008. **107**(1): p. 1-19.
344. Zai, L.J. and J.R. Wrathall, *Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury*. Glia, 2005. **50**(3): p. 247-57.
345. De Nicola, A.F., et al., *Progesterone treatment of spinal cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination*. J Mol Neurosci, 2006. **28**(1): p. 3-15.
346. De Nicola, A.F., et al., *Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(2): p. 173-87.
347. Garcia-Ovejero, D., et al., *Progesterone reduces secondary damage, preserves white matter, and improves locomotor outcome after spinal cord contusion*. J Neurotrauma, 2014. **31**(9): p. 857-71.
348. Coronel, M.F., F. Labombarda, and S.L. Gonzalez, *Neuroactive steroids, nociception and neuropathic pain: A flashback to go forward*. Steroids, 2016. **110**: p. 77-87.
349. Coronel, M.F., et al., *Progesterone modulates pro-inflammatory cytokine expression profile after spinal cord injury: Implications for neuropathic pain*. J Neuroimmunol, 2016. **292**: p. 85-92.
350. Garay, L., et al., *Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Res, 2009. **1283**: p. 177-85.
351. Garay, L.I., et al., *Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neuroscience, 2012. **226**: p. 40-50.
352. Yates, M.A., et al., *Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2010. **220**(1-2): p. 136-9.
353. Yu, H.J., et al., *Progesterone attenuates neurological behavioral deficits of experimental autoimmune encephalomyelitis through remyelination with nucleus-sublocalized Olig1 protein*. Neurosci Lett, 2010. **476**(1): p. 42-5.

354. Guo, Q., et al., *Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats*. Exp Neurol, 2006. **198**(2): p. 469-78.
355. Roof, R.L., et al., *Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats*. Exp Neurol, 1994. **129**(1): p. 64-9.
356. Roof, R.L., et al., *Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective*. Exp Neurol, 1996. **138**(2): p. 246-51.
357. Roof, R.L. and E.D. Hall, *Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone*. J Neurotrauma, 2000. **17**(5): p. 367-88.
358. Stein, D.G., *Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury?* Dialogues Clin Neurosci, 2011. **13**(3): p. 352-9.
359. Bayir, H., et al., *Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients*. J Neurotrauma, 2004. **21**(1): p. 1-8.
360. Groswasser, Z., M. Cohen, and O. Keren, *Female TBI patients recover better than males*. Brain Inj, 1998. **12**(9): p. 805-8.
361. Vandromme, M., S.M. Melton, and J.D. Kerby, *Progesterone in traumatic brain injury: time to move on to phase III trials*. Crit Care, 2008. **12**(3): p. 153.
362. Xiao, G., et al., *Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial*. Crit Care, 2008. **12**(2): p. R61.
363. Azcoitia, I., J.G. Yague, and L.M. Garcia-Segura, *Estradiol synthesis within the human brain*. Neuroscience, 2011. **191**: p. 139-47.
364. Gatson, J.W., et al., *Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 207-13.
365. Pedersen, A.L., J.L. Brownrout, and C.J. Saldanha, *Neuroinflammation and neurosteroidogenesis: Reciprocal modulation during injury to the adult zebra finch brain*. Physiol Behav, 2018. **187**: p. 51-56.
366. Chen, G., et al., *Decreased estradiol release from astrocytes contributes to the neurodegeneration in a mouse model of Niemann-Pick disease type C*. Glia, 2007. **55**(15): p. 1509-18.
367. Hu, R., et al., *Astrocyte-derived estrogen enhances synapse formation and synaptic transmission between cultured neonatal rat cortical neurons*. Neuroscience, 2007. **144**(4): p. 1229-40.
368. Peterson, R.S., et al., *Aromatase expression and cell proliferation following injury of the adult zebra finch hippocampus*. Dev Neurobiol, 2007. **67**(14): p. 1867-78.
369. Azcoitia, I., et al., *Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1007**: p. 298-305.
370. Chen, C., et al., *Estradiol modulates translocator protein (TSPO) and steroid acute regulatory protein (StAR) via protein kinase A (PKA) signaling in hypothalamic astrocytes*. Endocrinology, 2014. **155**(8): p. 2976-85.
371. Garcia-Estrada, J., et al., *Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury*. Brain Res, 1993. **628**(1-2): p. 271-8.
372. Garcia-Estrada, J., et al., *Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury*. Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(2): p. 145-51.
373. Perez-Alvarez, M.J., et al., *Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 157.
374. Arevalo, M.A., et al., *Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(10): p. 1106-12.
375. Azcoitia, I., et al., *Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol*. Eur J Neurosci, 2010. **32**(12): p. 1995-2002.



376. De Marinis, E., et al., *17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation*. J Neuroendocrinol, 2013. **25**(3): p. 260-70.
377. Guo, J., et al., *17beta-Estradiol prevents cell death and mitochondrial dysfunction by an estrogen receptor-dependent mechanism in astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reperfusion*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(11-12): p. 2151-60.
378. Carbonaro, V., et al., *Enhanced expression of ERalpha in astrocytes modifies the response of cortical neurons to beta-amyloid toxicity*. Neurobiol Dis, 2009. **33**(3): p. 415-21.
379. Dhandapani, K. and D. Brann, *Neuroprotective effects of estrogen and tamoxifen in vitro: a facilitative role for glia?* Endocrine, 2003. **21**(1): p. 59-66.
380. Sortino, M.A., et al., *Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death*. Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 5080-6.
381. Schaible, E.V., et al., *2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1alpha response after traumatic brain injury in mice*. J Neurochem, 2014. **129**(6): p. 940-54.
382. Naderi, V., et al., *Estrogen provides neuroprotection against brain edema and blood brain barrier disruption through both estrogen receptors alpha and beta following traumatic brain injury*. Iran J Basic Med Sci, 2015. **18**(2): p. 138-44.
383. Meloni, I., et al., *FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 436-40.
384. Paco, S., et al., *Cyclic AMP signaling restricts activation and promotes maturation and antioxidant defenses in astrocytes*. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 304.
385. Liu, Z., et al., *Drosophila Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission*. J Neurosci, 2011. **31**(6): p. 2052-63.
386. Zhang, Y., D. Chen, and Z. Wang, *Analyses of mental dysfunction-related ACSL4 in Drosophila reveal its requirement for Dpp/BMP production and visual wiring in the brain*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(20): p. 3894-905.
387. Meloni, I., et al., *The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture*. Neuroscience, 2009. **159**(2): p. 657-69.
388. Renieri, A., et al., *Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view*. J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 8-20.
389. Benda, P., et al., *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. **161**(3839): p. 370-1.
390. Quincozes-Santos, A., et al., *Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64372.
391. Shen, G., et al., *Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2008. **44**(7): p. 280-9.
392. McCarthy, K.D. and J. de Vellis, *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. J Cell Biol, 1980. **85**(3): p. 890-902.
393. Hipp, N., et al., *IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1443.
394. Fan, X., et al., *B-Myb Mediates Proliferation and Migration of Non-Small-Cell Lung Cancer via Suppressing IGFBP3*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
395. Tora, L., et al., *The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions*. Cell, 1989. **59**(3): p. 477-87.
396. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
397. Steichen, J.M., et al., *HIV Vaccine Design to Target Germline Precursors of Glycan-Dependent Broadly Neutralizing Antibodies*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 483-496.

398. Vesuna, F., P. Winnard, Jr., and V. Raman, *Enhanced green fluorescent protein as an alternative control reporter to Renilla luciferase*. *Anal Biochem*, 2005. **342**(2): p. 345-7.
399. Dandekar, D.H., et al., *A quantitative method for normalization of transfection efficiency using enhanced green fluorescent protein*. *Anal Biochem*, 2005. **342**(2): p. 341-4.
400. Hamurcu, Z., et al., *FOXO1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(13): p. 16619-35.
401. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
402. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
403. Chao, A., B.A. Schlinger, and L. Ramage-Healey, *Combined liquid and solid-phase extraction improves quantification of brain estrogen content*. *Front Neuroanat*, 2011. **5**: p. 57.
404. Yu, A.C., Y.L. Lee, and L.F. Eng, *Astroglisis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis*. *J Neurosci Res*, 1993. **34**(3): p. 295-303.
405. Huang, X.Q., et al., *Transforming growth factor beta1-induced astrocyte migration is mediated in part by activating 5-lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 145.
406. Zhan, J.S., et al., *Astrocytes in Migration*. *Neurochem Res*, 2017. **42**(1): p. 272-282.
407. Zhao, X., et al., *Expression of Ski and its role in astrocyte proliferation and migration*. *Neuroscience*, 2017. **362**: p. 1-12.
408. Atkins, G.B., et al., *Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(9): p. 1550-7.
409. Harding, H.P., et al., *Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(11): p. 1737-46.
410. Harris, J.M., et al., *Characterization of the retinoid orphan-related receptor-alpha coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(5): p. 998-1012.
411. Du, J. and R. Xu, *RORalpha, a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(12): p. 15755-66.
412. Xiong, G., et al., *RORalpha suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression*. *Cancer Res*, 2012. **72**(7): p. 1728-39.
413. Chen, H.Z., S.Y. Tsai, and G. Leone, *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(11): p. 785-97.
414. Giguere, V., *Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(6): p. 677-96.
415. Xie, W., et al., *Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptors 1 and 2*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(12): p. 2151-62.
416. Zhang, Z. and C.T. Teng, *Estrogen receptor-related receptor alpha 1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20837-46.
417. Barry, J.B., J. Laganier, and V. Giguere, *A single nucleotide in an estrogen-related receptor alpha site can dictate mode of binding and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha activation of target promoters*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(2): p. 302-10.
418. Giguere, Y., et al., *The association between heel ultrasound and hormone replacement therapy is modulated by a two-locus vitamin D and estrogen receptor genotype*. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(6): p. 1076-84.
419. Kraus, R.J., et al., *Estrogen-related receptor alpha 1 actively antagonizes estrogen receptor-regulated transcription in MCF-7 mammary cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(27): p. 24826-34.

420. Vanacker, J.M., et al., *Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha)*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(5): p. 764-73.
421. Yang, S.H., et al., *Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult*. Stroke, 2000. **31**(3): p. 745-9; discussion 749-50.
422. Wu, Y.M., et al., *Inverse agonist of estrogen-related receptor alpha suppresses the growth of triple negative breast cancer cells through ROS generation and interaction with multiple cell signaling pathways*. Oncotarget, 2016. **7**(11): p. 12568-81.
423. Wu, Y.M., et al., *Inhibition of ERRalpha suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 25588-601.
424. Jetten, A.M. and J.H. Joo, *Retinoid-related Orphan Receptors (RORs): Roles in Cellular Differentiation and Development*. Adv Dev Biol, 2006. **16**: p. 313-355.
425. Dzhagalov, I., N. Zhang, and Y.W. He, *The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(6): p. 401-7.
426. Lee, J.M., et al., *RORalpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer*. Mol Cell, 2010. **37**(2): p. 183-95.
427. Raichur, S., et al., *Identification and validation of the pathways and functions regulated by the orphan nuclear receptor, ROR alpha1, in skeletal muscle*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(13): p. 4296-312.
428. Sato, T.K., et al., *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock*. Neuron, 2004. **43**(4): p. 527-37.
429. Odawara, H., et al., *Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha in breast cancer cells: identification of a novel ROR response element*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17711-9.
430. Brozyna, A.A., et al., *RORalpha and RORgamma expression inversely correlates with human melanoma progression*. Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 63261-63282.
431. Dai, J., et al., *Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **176**(1-2): p. 111-20.
432. Bouwman, P. and S. Philipsen, *Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **195**(1-2): p. 27-38.
433. Greschik, H., et al., *Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 303-13.
434. Kallen, J., et al., *Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49330-7.
435. Xie, C.Q., et al., *Expression profiling of nuclear receptors in human and mouse embryonic stem cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(5): p. 724-33.
436. Fu, M., et al., *A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(10): p. 2437-50.
437. Bonnelye, E. and J.E. Aubin, *Differential expression of estrogen receptor-related receptor alpha and estrogen receptors alpha and beta in osteoblasts in vivo and in vitro*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(8): p. 1392-400.
438. Bonnelye, E., et al., *Estrogen receptor-related receptor alpha impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis*. Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3658-70.
439. Ariazi, E.A., G.M. Clark, and J.E. Mertz, *Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6510-8.
440. Suzuki, T., et al., *Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4670-6.

441. Stein, R.A., S. Gaillard, and D.P. McDonnell, *Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **114**(1-2): p. 106-12.
442. Fradet, A., et al., *Dual function of ERRalpha in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5728-38.
443. Bianco, S., et al., *Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23286-92.
444. Brown, E.L., et al., *PGC-1alpha and PGC-1beta increase CrT expression and creatine uptake in myotubes via ERRalpha*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(12): p. 2937-43.
445. Liu, D., H. Benlhabib, and C.R. Mendelson, *cAMP enhances estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) transcriptional activity at the SP-A promoter by increasing its interaction with protein kinase A and steroid receptor coactivator 2 (SRC-2)*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): p. 772-83.
446. Matsuyama, R., et al., *Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18166-76.
447. You, J., et al., *Receptor-interacting Protein 140 represses Sirtuin 3 to facilitate hypertrophy, mitochondrial dysfunction and energy metabolic dysfunction in cardiomyocytes*. Acta Physiol (Oxf), 2017. **220**(1): p. 58-71.
448. Lyons, A., et al., *Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells*. J Biol Chem, 2017. **292**(41): p. 16983-16998.
449. Attwooll, C., E. Lazzerini Denchi, and K. Helin, *The E2F family: specific functions and overlapping interests*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4709-16.
450. Harbour, J.W. and D.C. Dean, *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2393-409.
451. Oberley, M.J., D.R. Inman, and P.J. Farnham, *E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42466-76.
452. Chong, J.L., et al., *E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells*. Nature, 2009. **462**(7275): p. 930-4.
453. Xu, X., et al., *A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members*. Genome Res, 2007. **17**(11): p. 1550-61.
454. Di Fiore, B., et al., *Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2)*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(14): p. 2852-9.
455. Valen, E. and A. Sandelin, *Genomic and chromatin signals underlying transcription start-site selection*. Trends Genet, 2011. **27**(11): p. 475-85.
456. Kim, K., et al., *Analysis of estrogen receptor alpha-Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 843-54.
457. Da Pozzo, E., et al., *TSPO PIGA Ligands Promote Neurosteroidogenesis and Human Astrocyte Well-Being*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
458. Staub, F., et al., *Clearance and metabolism of arachidonic acid by C6 glioma cells and astrocytes*. Neurochem Res, 1995. **20**(12): p. 1449-56.
459. Ciccarelli, R., et al., *Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(6): p. 1514-24.
460. Huang, X.J., et al., *Activation of CysLT receptors induces astrocyte proliferation and death after oxygen-glucose deprivation*. Glia, 2008. **56**(1): p. 27-37.